BINDUNG VON PHARMAKA AN PLASMAPROTEINE BEI EXPERIMENTELL ERZEUGTER NIERENINSUFFIZIENZ

Wolfgang K.W. Gerdsmeier

Diss
München
1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0014

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr.med. W. Forth

BINDUNG VON PHARMAKA AN PLASMAPROTEINE BEI EXPERIMENTELL ERZEUGTER NIERENINSUFFIZIENZ

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang K.W. Gerdsmeier

München, 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Forth
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG 1

2. METHODIK 3

2.1. Erzeugung einer Niereninsuffizienz bei Kaninchen 3

2.1.1. Niereninsuffizienz durch Glycerin-Injektion. 3

2.1.2. Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat-Injektion 3

2.1.3. Niereninsuffizienz durch 5/6-Nephrektomie .. 4

2.2. Meßmethoden 7

2.2.1. Bestimmung des Kreatinin-, Harnstoff- und Proteingehalts im Plasma 7

2.2.2. Bestimmung der Bindung an Plasmaproteine ... 7

2.2.3. Substanzen und Nachweismethoden 9

2.2.4. Berechnung der Bindungsparameter 11

2.3. Sonstige Methoden 13

2.3.1. Einfluß von Kreatinin, Harnstoff und Uranylnitrat auf die Bindung von Propranolol in vitro 13

2.3.2. Extraktion des Plasmas mit Aktivkohle 13

2.4. Statistische Methoden 14

3. ERGEBNISSE 15

3.1. mit Uranylnitrat behandelte Tiere 15

3.2. mit Glycerin behandelte Tiere 19

3.3. nephrektomierte Tiere 22

3.4. Weitere Untersuchungen 28

3.4.1. Abhängigkeit der Bindung vom Grad der Niereninsuffizienz 28

3.4.2. Einfluß von Kreatinin, Harnstoff und Uranylnitrat auf die Bindung von Propranolol in vitro 32

3.4.3. Bindung von Propranolol nach Extraktion des Plasmas mit Aktivkohle 33

3.4.4. Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Pharmakons 34

4. DISKUSSION 39

4.1. Akutes Nierenversagen beim Menschen und im tierexperimentellen Modell 39

4.1.1. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch subkutane Glycerininjektion 40

4.1.2. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat 41

4.1.3. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch subtotale Nephrektomie 42

4.2. Interpretation der Kreatinin-, Harnstoff- und Proteinkonzentrationen im Plasma 44

4.3. Bestimmung der Proteinbindung durch Gleichgewichtsdialyse 46

4.4. Besprechung der Ergebnisse 49

4.4.1. Plasmaproteinbindung saurer Substanzen 49

4.4.2. Plasmaproteinbindung basischer Substanzen .. 53

4.4.3. Abhängigkeit der Bindung vom Grad der Niereninsuffizienz 56

4.4.4. Konzentrationsabhängigkeit und Bindungskonstanten 58

4.5. Vergleich der experimentell erzeugten Bindungsänderungen mit Ergebnissen von menschlichen Patienten 60

5. ZUSAMMENFASSUNG 64

6. LITERATURVERZEICHNIS 66

7. LEBENSLAUF 77

1. PROBLEMSTELLUNG

Die Bindung von Pharmaka an Plasmaproteine hat einen Einfluß auf Verteilung, Ausscheidung, Metabolismus und Wirkung von Pharmaka (ROWLAND a. TOZER 1980, KURZ 1978). Nachdem Änderungen der Bindung an Plasmaproteine bei Patienten mit Niereninsuffizienz wiederholt nachgewiesen wurden (vgl. z. B. die Übersichtsarbeiten von BELPAIRE et al. 1977 b und PIAFSKY 1980), erscheint eine nähere Untersuchung der Proteinbindung bei Niereninsuffizienz wichtig, weil diese Patienten wegen oftmals vorhandener Begleiterkrankungen mit zahlreichen Medikamenten behandelt werden müssen. Die Untersuchung an Patienten ist jedoch erschwert, weil die Bindung an Plasmaproteine auch durch andere Einflüsse verändert sein kann (Einflüsse der Therapie, des Alters und der Lebensbedingungen).

Es stellt sich daher die Frage, ob Änderungen der Bindung an Plasmaproteine durch Niereninsuffizienz beim Menschen aus Ergebnissen von Tierversuchen vorhergesagt werden können. Wir untersuchten die Bindung an Plasmaproteine an gesunden Kaninchen und an Kaninchen, bei denen durch folgende Methoden eine Niereninsuffizienz artifiziell erzeugt worden war:

1. durch subkutane Injektion von Glycerin,
2. durch intravenöse Injektion von Uranylnitrat,
3. durch subtotale Nephrektomie.

Zur Untersuchung der Bindung an Plasmaproteine wählten wir Substanzen, die für die Behandlung menschlicher Patienten bedeutsam sind. Phenytoin und Propranolol wurden in der vorliegenden Arbeit am gründlichsten untersucht. Phenytoin ist ein Beispiel für eine schwache organische Säure und Propranolol ein Beispiel für eine schwache organische Base. Diese beiden Substanzen wer-

den nicht in nennenswertem Umfang über die Niere eliminiert (REIDENBERG et al. 1971, THOMPSON et al. 1972). Sie gehören daher nicht zu der Gruppe von Pharmaka, deren therapeutische Dosis bei Niereninsuffizienz wegen der erhöhten Kumulationsgefahr vermindert werden muß. Phenytoin und Propranolol werden gegen die Begleiterkrankungen der akuten und chronischen Niereninsuffizienz (Herzrhythmusstörungen, Krampfanfälle oder Hypertonie) häufig angewandt und ihre Dosierung stößt bei Niereninsuffizienz auf Probleme (ODAR-CEDERLÖF a. BORGA 1974, PIAFSKY et al. 1978), die nicht durch Kumulation erklärt werden können.

Die weiteren Pharmaka wurden als Vertreter wichtiger Arzneistoffgruppen ausgewählt: Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon, Warfarin, Pentobarbital, Thiopental, Diazepam, Chlorpromazin, Imipramin, Chinidin und Digitoxin.

2. METHODIK

2.1. Erzeugung einer Niereninsuffizienz bei Kaninchen

Die Versuche wurden mit Kaninchen beiderlei Geschlechts (Körpergewicht zwischen 2,5 und 3,5 kg) durchgeführt. Die akute Niereninsuffizienz wurde durch drei verschiedene Methoden erzeugt.

2.1.1. Niereninsuffizienz durch Glycerin-Injektion

Die erste Methode zur Erzeugung einer akuten Niereninsuffizienz bestand in der einmaligen Injektion relativ großer Mengen von Glycerin (nach FINCK 1959). Jedem so behandelten Tier wurde 10 ml pro kg Körpergewicht einer 65 % igen Glycerinlösung (verdünnt mit sterilem Wasser) subkutan injiziert. Einer entsprechenden Kontrollgruppe von Tieren wurde 10 ml/kg KG isotone Kochsalzlösung subkutan verabreicht. 20 Stunden vor der Injektion wurde den Tieren das Trinkwasser entzogen, unmittelbar nach der Injektion konnten die Tiere wieder uneingeschränkt trinken.

Die Tiere wurden zwei Tage nach der Injektion durch Entbluten getötet. Das gewonnene Blut wurde unter Zusatz von Heparin (10 I.E./ml) in Glasbehältern aufgefangen, zentrifugiert und das erhaltene Blutplasma bis zur weiteren Verarbeitung bei -25°C eingefroren.

2.1.2. Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat-Injektion

Bei einer weiteren Gruppe von Tieren wurde die akute Niereninsuffizienz durch intravenöse Injektion von Uranylnitrat erzeugt (BELPAIRE et al. 1977 a). Die so behandelten Tiere erhielten pro kg KG 2 ml einer 1% igen Lösung von Uranylnitrat ($UO_2(NO_3)$ x 6 H_2O), gelöst in sterilem Wasser. Die entsprechende Kontrollgruppe erhielt eine Injektion isotoner Kochsalzlösung.
Die Tiere wurden nach 6 Tagen getötet. Das gewonnene Blut wurde entsprechend 2.2.1. weiter verarbeitet.

2.1.3. Niereninsuffizienz durch 5/6 - Nephrektomie

In der dritten Gruppe wurde die Niereninsuffizienz durch partielle Nephrektomie erzeugt. Die Operation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Narkose erhielt das Tier eine Kombination von Thalamonal^{R} und Ketanest^{R} (Tabelle 1).

Bei diesem Eingriff wurde die Bauchhöhle durch einen 10 cm langen Transabdominalschnitt in der Medianlinie eröffnet.

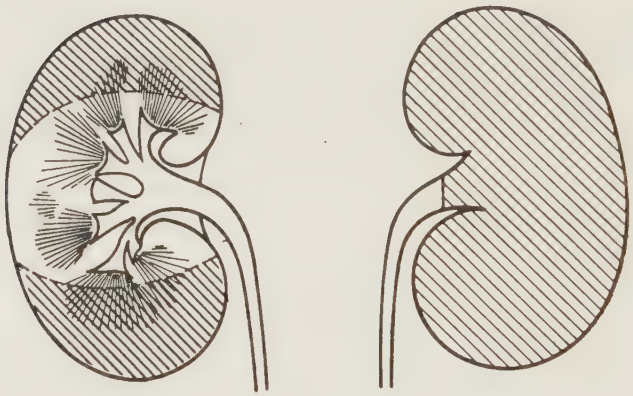


Abb. 1: Schematische Darstellung der 5/6-Nephrektomie. Akute Niereninsuffizienz wird durch operative Entfernung der schraffiert dargestellten Teile erzeugt.

Tabelle 1: *Zeitplan und Dosierung der für die Anästhesie angewandten Medikamente. Alle genannten Medikamente wurden intravenös verabreicht.*

Vorbereitung		Valium® Amp.	0,40 ml/kgKG
		Thalamonal®	0,15 ml/kgKG
		Ketanest®	0,30 ml/kgKG
Einleitung		Epontol®	0,70 ml/kgKG
(vor dem Hautschnitt)		Ketanest®	0,14 ml/kgKG
Erhaltungsnarkose			
Phase 1	alle 5 Min	Ketanest®	0,07 ml/kgKG
(0 bis 30 Min)	alle 20 Min	Thalamonal®	0,20 ml/kgKG
Phase 2	alle 8 Min	Ketanest®	0,07 ml/kgKG
(nach 30 Min)	alle 20 Min	Thalamonal®	0,20 ml/kgKG

Inhaltsstoffe pro ml Lösung

Valium® Amp.	1 ml enthält	5 mg Diazepam
Thalamonal®	1 ml enthält	2,5 mg Droperidol und 0,0785 mg Fentanyldihydrogencitrat
Ketanest®	1 ml enthält	57,67 mg Ketaminhydrochlorid
Epontol®	1 ml enthält	50 mg Propanidid

Die rechte Niere wurde wurde vom unteren Pol her aus dem umgebenden Bindegewebe freipräpariert, ohne die Nierenkapsel zu eröffnen. Eine Traumatisierung der Nebenniere und ihrer Gefäße wurde vermieden. Nierenarterie und -vene wurden für die Dauer von 20 Min. mit Gefäßklemmen abgeklemmt, um starke Blutverluste beim weiteren Vorgehen zu vermeiden. Die bindegewebige Nierenkapsel wurde an beiden Polen durchtrennt und vorsichtig zurückgeschoben. Aus dem freigelegten Parenchymgewebe wurde keilförmig von beiden Seiten her jeweils 2,5 g Nierengewebe herauspräpariert und entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, das Nierenbecken nicht zu verletzen. Zur Verbesserung der Blutstillung wurden die Schnittflächen mit Thrombinlösung behandelt (Topostasin^{R}, Firma Hoffmann-La Roche AG). Die erhalten gebliebene Nierenkapsel wurde mit Catgut-Nahtmaterial vernäht, anschließend die Gefäßklemmen eröffnet und die Niere belassen.

Sofort anschließend wurde die linke Niere nach der gleichen Methode freipräpariert und nach Ligatur der Gefäße und des Ureters exzidiert. Die Bauchwand wurde durch Nähte wieder geschlossen.

Die Kontrollgruppe, bei der keine Niereninsuffizienz erzeugt werden sollte, wurde einer Scheinoperation unterzogen. Bei diesen Tieren wurden ebenfalls die Nieren freipräpariert und die Blutversorgung für die Dauer von jeweils 20 min unterbrochen. Im Unterschied zu den nephrektomierten Tieren wurden jedoch nur unbedeutende Teile des oberflächlichen Parenchymgewebes entnommen.

Den operierten Tieren wurde am ersten, zweiten, vierten und siebten Tag nach der Operation jeweils 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, nachdem das Ohr durch eine Rotlichtlampe hyperämisiert worden war. Das entnommene Blut wurde in Gläsern mit Heparinzusatz aufgefangen, zentrifugiert und das Plasma bei -25^{o}C eingefroren.

2.2. Meßmethoden

2.2.1. Bestimmung des Kreatinin-, Harnstoff- und Proteingehalts im Plasma

Bei sämtlichen behandelten Tieren und den dazugehörigen Kontrollgruppen wurde vor dem Eingriff sowie in geeigneten Abständen nach dem Eingriff ca. 2 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, um die Entwicklung der Niereninsuffizienz zu beobachten. In diesen sowie in allen Plasmaproben, die für spätere Bindungsversuche bestimmt waren, wurden die Kreatinin-, Harnstoff- und Proteinkonzentrationen bestimmt.

Methoden[1]	Kreatinin	Pikrinsäure-Farbstoffreaktion nach JAFFE[1]
	Harnstoff	BERTHOLET-Reaktion MERCKOTEST^{R}
	Protein	BIURET-Reaktion MERCKOTEST^{R}

2.2.2. Bestimmung der Bindung an Plasmaproteine

Das Ausmaß der Bindung an Plasmaproteine wurde mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt.

Verwendetes Gerät: DIANORM^{R}-Gleichgewichtsdialysator
(Fa. Bachofer, Reutlingen)

---

1) E.MERCK, Klinisches Labor, 11. Auflage 1970
(Firmenschrift)

Die Dialysezelle (Abb. 2) besteht aus zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran (Dialysemembran DIACHEMA^{R}, Fa. Diachema AG, Rüschlikon, Schweiz) mit einer mittleren Porenweite von 15 bis 20 x 10^{-8}cm voneinander getrennt sind. Eine Kammer enthält Blutplasma (proteinhaltige Phase), das nach den vorher genannten Methoden gewonnen wurde. Die zweite Kammer enthält isotone Phosphatpufferlösung pH 7,4, der eine definierte Menge eines Pharmakons zugesetzt wurde. Die Dialyse erfolgte über mindestens 16 Stunden bei 4^{o}C.

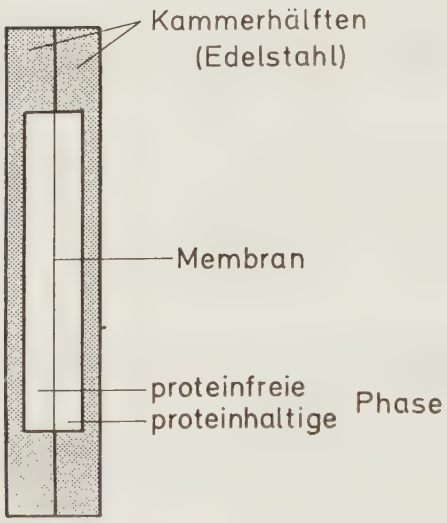


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Dialysezelle

2.2.3. Substanzen und Nachweismethoden

Folgende Pharmaka wurden bezüglich ihrer Bindung an Plasmaproteine untersucht:

Säuren:	pK_a	molekulare Masse
ACETYLSALICYLSÄURE	3,5	180,15
PENTOBARBITAL	8,11	248,3
PHENYLBUTAZON	4,5	308,37
PHENYTOIN	9,2	274,3
THIOPENTAL-Na	7,45	264,33
WARFARIN-Na	5,1	308,32
Basen:		
CHINIDIN	8,4	324,4
CHLORPROMAZIN	9,30	318,82
DIAZEPAM	3,3	284,76
IMIPRAMIN	9,5	280,4
PROPRANOLOL	9,42	283,8
neutrale Pharmaka:		
DIGITOXIN	--	780,9

Bei einem Teil der verwendeten Substanzen wurde der Konzentrationsnachweis mit Hilfe radioaktiver Isotopen durchgeführt. Hierbei wurde der wässrigen Lösung der Testsubstanz (Konzentration siehe Tab. 2 und 3) je etwa 0,5/uCi radioaktiv markiertes Pharmakon zugesetzt.

Verwendete radioaktiv markierte Substanzen

	Bezugs-quelle	spezif. Aktivität Ci/mmol
^{14}C-Acetylsalicylsäure	AB	0,020
^{14}C-Pentobarbital	NEN	0,052
^{14}C-Phenytoin	AB	0,055
^{14}C-Warfarin	AB	0,049
^{3}H-Chlorpromazin	NEN	26,5
^{14}C-Diazepam	AB	0,057
^{3}H-Imipramin	AB	23,0
^{3}H-Propranolol	AB	22,0
^{3}H-Digitoxin	NEN	13,8

Lieferfirmen: AB = Amersham Buchler, Braunschweig
NEN = New England Nuclear, Dreieich

Die radiochemische Reinheit war bei allen Substanzen mit mehr als 97 % angegeben.
Je nach ihrer spezifischen Aktivität wurden die markierten Substanzen - bei vorgegebener molarer Konzentration - entweder direkt oder nach Verdünnen mit nichtmarkierter Substanz eingesetzt.

Die Konzentration an radioaktiv markiertem Pharmakon wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt. Verwendetes Gerät: PACKARD Szintillationszähler TRI CARB Mod. 3255. Hierbei wurden jeweils 100 µl Probe des Plasmas bzw. 200 µl Probe der proteinfreien Pufferlösung mit 15 ml Brays-Lösung versetzt.

Nachweis von Chinidin: Alkalisieren mit 0,1 n NaOH, Extraktion mit Heptan (mit 1,5 % Amylalkohol), Reextraktion und Nachweis in 0,1 n H_2SO_4 durch Fluoreszenz

bei 443 nm nach Anregung bei 359 nm (Deutsches Arzneibuch, 1973).

Nachweis von Thiopental: nach BRODIE et al. (1950) in folgender Modifikation: Zur Extraktion wurde KH_2PO_4 statt Na_2PO_4 verwendet. Zur Reextraktion wurde 1 n NaOH statt 2,5 n NaOH verwendet und 30 min statt 2 min geschüttelt.

Phenylbutazon wurde nach der Methode von BURNS et al. (1953) bestimmt.

2.2.4. Berechnung der Bindungsparameter

Bei der Gleichgewichtsdialyse stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen der gebundenen Substanz (c_b) und der frei gelösten Substanz (c_f) ein.
Die freie Substanz diffundiert durch eine Membran, bis in der proteinhaltigen und der proteinfreien Kammerhälfte die gleichen Konzentrationen an freier Substanz (c_f) herrschen. Hierbei wird die eingesetzte Gesamtmenge auf beide Kammerhälften verteilt. Da beide Volumina gleich sind, gilt

$$c_g = c_a + c_i. \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Dabei ist c_g die Gesamtkonzentration, die vor Dialyse eingesetzt wurde, c_a die Konzentration in der proteinfreien Kammerhälfte und c_i die Konzentration im proteinhaltigen Plasma. Da sich die gebundene Substanz (c_b) nur im proteinhaltigen Kompartiment befindet, gilt

$$c_a = c_f \qquad \text{(Gl. 2)}$$

und

$$c_i = c_f + c_b. \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Da die freie Konzentration c_f gleich c_a ist, ergibt sich für die gebundene Konzentration:

$$c_b = c_i - c_a \qquad (Gl. 4)$$

Unter der Voraussetzung, daß im Plasma nur eine Klasse von Bindungsstellen für ein Pharmakon vorhanden ist und diese Bindung sättigbar ist, kann eine maximale Konzentration an gebundenem Molekül $c_b max$ (Bindungskapazität) berechnet werden. Dieser Zusammenhang läßt sich durch die Langmuir-Isotherme umschreiben:

$$c_b = \frac{K \times c_b max}{1 + K \times c_f} \times c_f \qquad (Gl. 5)$$

Hierbei ist K die Assoziationskonstante.
In einem System mit 2 Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen läßt sich die gebundene Konzentration als Summe der gebundenen Teilkonzentrationen ausdrücken (ROSENTHAL 1967):

(Gl. 6)

$$c_b = c_{b1} + c_{b2} = \frac{K_1 \times c_b max_1}{1 + K_1 \times c_f} \times c_f + \frac{K_2 \times c_b max_2}{1 + K_2 \times c_f} \times c_f$$

Die Bindungskonstanten $c_b max_1$, $c_b max_2$, K_1 und K_2 wurden durch nichtlineare Regression mittels eines veröffentlichten Rechnerprogramms errechnet (PFEFFER 1973).
Zur graphischen Darstellung diente die Umformung der Langmuir-Isotherme nach SCATCHARD (1949):

$$\frac{c_b}{c_f} = K \times c_b max - K \times c_b \qquad (Gl. 7)$$

Liegen zwei Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen vor, lassen sich die errechneten Bindungskonstanten in der SCATCHARD-Darstellung durch zwei Geraden darstellen, die beide die Gleichung 7 erfüllen.
Wenn die Bindungsstellen nicht sättigbar sind, läßt sich das Produkt $K \times c_b max$ errechnen. In diesem Fall erscheinen die Bindungsdaten in der SCATCHARD-Darstellung als Gerade parallel zur Abszisse.

$$\frac{c_b}{c_f} = K \times c_b max \qquad (Gl. 8)$$

Rechengerät: OLIVETTI, Typ P 6060

2.3. Sonstige Methoden

Die folgenden Untersuchungen wurden entweder mit dem Plasma von Tieren durchgeführt, bei denen eine Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat erzeugt worden war oder mit dem Plasma der dazugehörigen Kontrollgruppe, die eine Injektion von isotoner Kochsalzlösung erhalten hatten.

2.3.1. Einfluß von Kreatinin, Harnstoff und Uranylnitrat auf die Bindung von Propranolol in vitro

Es wurde geprüft, ob der Zusatz dieser Substanzen die Bindung von Propranolol beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde dem Plasma der nichtinsuffizienten Kontrollgruppe jeweils eine dieser Substanzen in folgender Konzentration zugesetzt:

Kreatinin	20 mg / 100 ml
Harnstoff	1000 mg / 100 ml
Uranylnitrat	10 mg / 100 ml

Anschließend wurde dieses Plasma gegen Pufferlösung mit Zusatz von Propranolol in verschiedenen Konzentrationen dialysiert, um zu prüfen, ob der Zusatz einer dieser Substanzen einen der Bindungsparameter (siehe 2.2.4.) ändern kann.

2.3.2. Extraktion des Plasmas mit Aktivkohle

Die Extraktion wurde nach der Methode von CHEN (1967) durchgeführt, der die Extraktion von Fettsäuren aus Serumalbumin beschreibt. Bei dieser Methode wird das Serumalbumin auf pH 3,0 angesäuert und mit Aktivkohle versetzt.
Wir prüften, ob die Behandlung mit Aktivkohle nach der

Methode von CHEN die Bindung der basischen Substanz Propranolol beeinflußt. Zu diesem Zweck wurde das Plasma einiger niereninsuffizienter Tiere nach Ansäuerung mit HCl auf pH 3,0 mit Aktivkohle behandelt und nach Abtrennen der Aktivkohle mit Na_2CO_3 wieder auf pH 7,4 eingestellt. Die Bindung von Propranolol wurde vor und nach Aktivkohlebehandlung bestimmt.

2.4. Statistische Methoden

verwendete Geräte: HEWLETT PACKARD HP 97
OLIVETTI P 6060

Die statistischen Methoden wurden nach SACHS (1978) angewendet. Zum Vergleich von Mittelwerten diente der t-Test nach STUDENT, das Signifikanzniveau ist jeweils angegeben. Als Maß für die Streuung der erhaltenen Einzelwerte wurde jeweils der Mittelwert mit dem errechneten Standardfehler dargestellt.

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zweier Parameter wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN (r_s) berechnet, da nicht in allen Fällen lineare Zusammenhänge vorausgesetzt werden konnten. Ausnahmsweise wurde auch der Korrelationskoeffizient r angegeben, um mögliche lineare Zusammenhänge zu diskutieren.

3. ERGEBNISSE

3.1. mit Uranylnitrat behandelte Tiere

Die mit Uranylnitrat behandelten Tiere zeigten nach einigen Tagen einen deutlichen Anstieg sowohl der Kreatinin- als auch der Harnstoffkonzentrationen im Plasma (Abb. 3). In der Kontrollgruppe änderten sich die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma während der Versuchsdauer nicht. Nach Versuchsende wurde der Gesamtproteingehalt im Plasma bei den niereninsuffizienten Tieren mit 64 $\pm$ 5 mg / ml und bei der Kontrollgruppe mit 61 $\pm$ 5 mg / ml bestimmt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p > 0{,}05$).

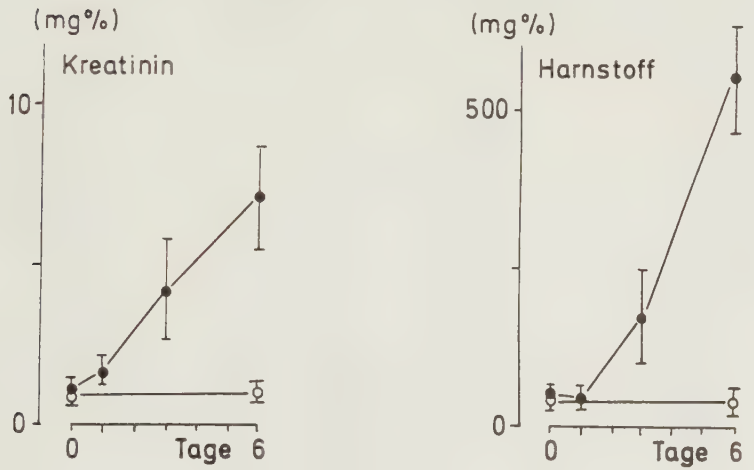


Abb. 3: Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma während der Versuchsdauer

- ● *mit Uranylnitrat behandelte Tiere (n = 5)*
- ○ *mit isotoner Kochsalzlösung behandelt (n = 5)*

Die Injektionen erfolgten jeweils am Tag 0.

In Tabelle 2 sind die Substanzen dargestellt, deren Bindung an Plasma von Tieren untersucht wurde, bei denen eine akute Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat erzeugt worden war. Die verwendete Substanzkonzentration entspricht der therapeutischen Konzentration im Blutplasma menschlicher Patienten.

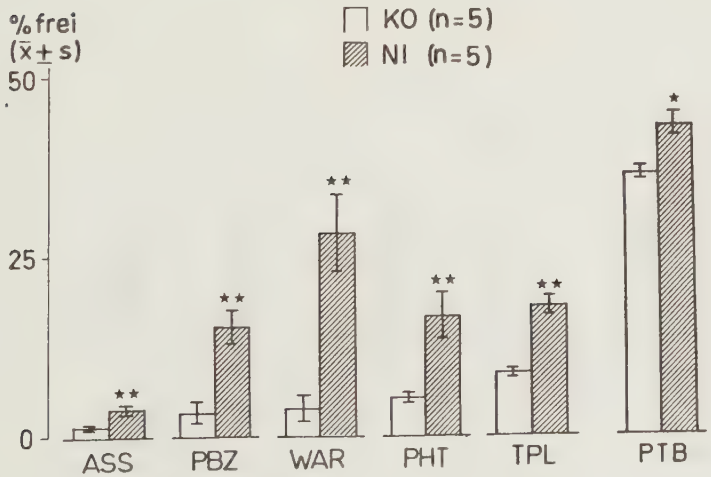
Tabelle 2 : Bindung verschiedener Substanzen an Kaninchenplasma nach Erzeugung einer akuten Niereninsuffizienz mit Uranylnitrat

Substanz	Konzentration in der Pufferlösung (Mol/l)	Urämische Gruppe (% gebunden) n = 5	Kontrollgruppe (% gebunden) n = 5
Acetylsalicylsäure	1×10^{-4}	94,5 ± 0,5	98,8 ± 0,1
Phenylbutazon	1×10^{-4}	84,7 ± 2,0	96,8 ± 1,5
Warfarin	1×10^{-5}	71,1 ± 9,8	95,9 ± 1,8
Phenytoin	6×10^{-5}	83,3 ± 6,2	94,6 ± 0,8
Thiopental	1×10^{-4}	82,1 ± 1,3	91,3 ± 0,2
Pentobarbital	2×10^{-5}	56,8 ± 3,6	63,9 ± 2,4
Diazepam	2×10^{-6}	85,3 ± 0,6	93,3 ± 0,4
Chlorpromazin	2×10^{-6}	95,7 ± 0,3	95,8 ± 0,2
Chinidin	2×10^{-5}	83,1 ± 5,8	85,6 ± 1,7
Propranolol	2×10^{-6}	84,2 ± 9,1	64,0 ± 5,7
Imipramin	1×10^{-6}	86,5 ± 4,3	82,1 ± 3,3
Digitoxin	3×10^{-8}	91,1 ± 0,4	91,4 ± 1,3

Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse für schwache organische Säuren. Bei allen verwendeten sauren Substanzen ist der freie Anteil bei Niereninsuffizienz, die durch Uranylnitrat erzeugt wurde, stark erhöht. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit Ausnahme des Pentobarbitals signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ (Pentobarbital $p < 0,05$).

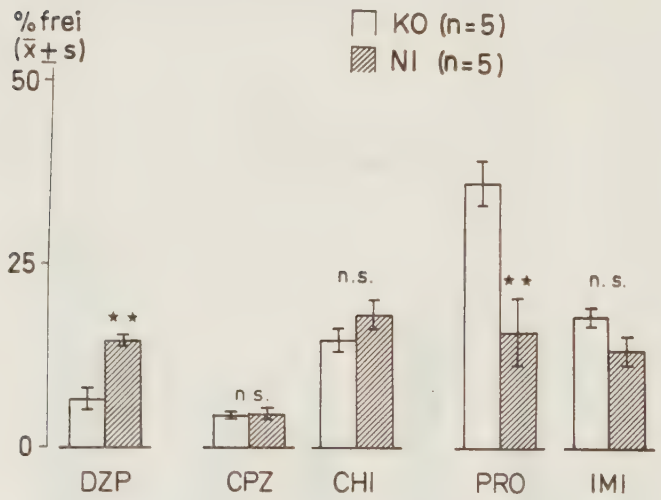
Abb. 4: Bindung saurer Substanzen an Blutplasma bei Niereninsuffizienz, die durch Uranylnitrat erzeugt wurde, verglichen mit nichtinsuffizienten Kontrollen; hier dargestellt durch den freien Anteil.

*NI = Tiere mit Niereninsuffizienz, KO = Kontrollgruppe, ASS = Acetylsalicylsäure, PBZ = Phenylbutazon, WAR = Warfarin, PHT = Phenytoin, TPL = Thiopental, PTB = Pentobarbital, s = Standardfehler. ** = signifikante Unterschiede mit $p < 0,01$, * = signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$.*



Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse für basische Substanzen. Hier sind die Ergebnisse weniger einheitlich. Beim Diazepam finden wir ebenfalls eine Erhöhung des freien Anteils, dies entspricht einer Abnahme des gebundenen Anteils von 93,5 % auf 85, 3 %. Bei Chinidin, Chlorpromazin und Imipramin jedoch fanden wir keinen signifikanten Unterschied. Beim Propranolol hingegen nahm der freie Anteil bei Niereninsuffizienz deutlich ab. Das Propranolol stellte somit eine Ausnahme dar.

*Abb. 5: Bindung basischer Substanzen an Blutplasma bei Niereninsuffizienz, die durch Uranylnitrat erzeugt wurde (NI), verglichen mit nichtinsuffizienten Kontrollen (KO); hier dargestellt durch den freien Anteil. DZP = Diazepam, CPZ = Chlorpromazin, CHI = Chinidin, PRO = Propranolol, s = Standardfehler. Die mit ** gekennzeichneten Substanzen zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0{,}01$). n.s. = nicht signifikant.*



Digitoxin (nicht abgebildet) liegt im physiologischen pH - Bereich nicht ionisiert vor; sein freier Anteil änderte sich bei Niereninsuffizienz nicht signifikant (s. Tab. 2).

3.2. Mit Glycerin behandelte Tiere

Auch durch subkutane Glycerin-Injektion ließ sich eine Erhöhung der Plasmakreatinin- und Harnstoffkonzentrationen erzeugen. Die Abbildung 6 zeigt eine Zusammenstellung der bei Versuchsende zwei Tage nach der Injektion erhaltenen Meßwerte. Nicht alle mit Glycerin behandelten Tiere zeigten erhöhte Kreatinin- und Harnstoffwerte.

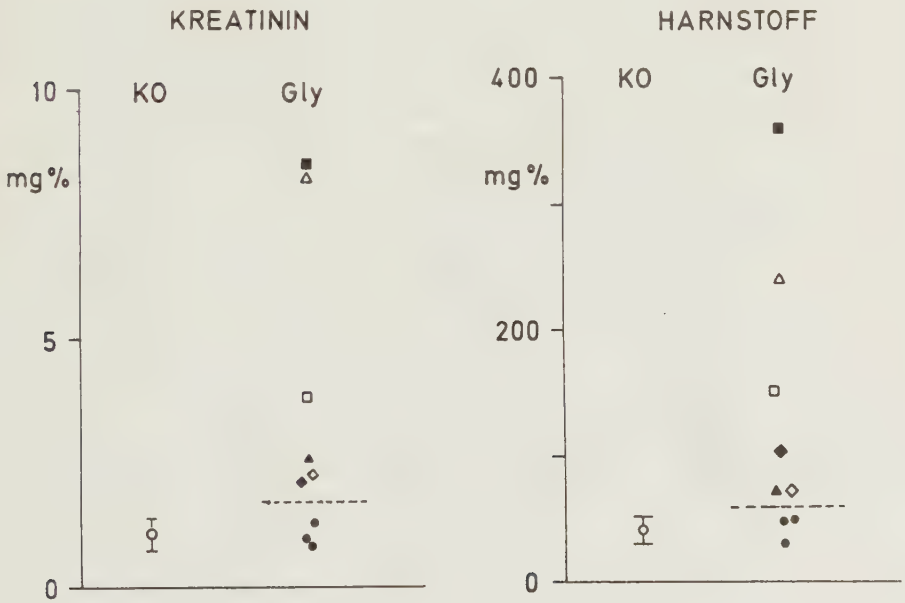


Abb. 6: Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma 2 Tage nach der Glycerininjektion (Gly), verglichen mit der Kontrollgruppe KO (n = 8). Bei den 6 niereninsuffizienten Tieren wurde zur Darstellung der Meßwerte jeweils das gleiche Symbol für ein Tier verwendet.

Die Tiere, an deren Blutplasma Bindungsuntersuchungen durchgeführt wurden, sind daher in drei Gruppen eingeteilt: Eine Kontrollgruppe (n = 8), die mit Kochsalzlösung behandelt wurde, eine nicht urämische Gruppe (n = 3), deren Plasmakreatininkonzentrationen nach Glycerininjektion unter 1,2 mg% lagen und damit der Kontrollgruppe entsprachen, sowie einer urämischen Gruppe (n = 6), deren Plasmakreatininkonzentrationen zwischen 1,8 und 8,3 mg% lagen. Die Tabelle 3 zeigt die erhaltenen Bindungswerte der angewendeten Substanzen.

Die Gesamtproteinkonzentration des Plasmas änderte sich nicht. Sie betrug 62 ± 5 mg/ml bei der Kontrollgruppe gegenüber 61 ± 2 mg/ml bei der nicht urämischen und 64 ± 6 mg/ml bei der urämischen Gruppe.

Substanz	Konzentration in der Pufferlösung (Mol/l)	Urämische Gruppe (% gebunden) n = 6	Nicht-urämische Gruppe (% geb.) n = 3	Kontrollgruppe (% gebunden) n = 8
Warfarin	1×10^{-5}	90,8 ± 2,8	94,9 ± 2,1	95,1 ± 1,6
Phenytoin	6×10^{-5}	86,4 ± 5,1	94,9 ± 0,3	95,0 ± 1,1
Chinidin	2×10^{-5}	87,5 ± 4,1	88,8 ± 2,5	88,3 ± 2,3
Propranolol	2×10^{-6}	81,0 ± 5,2	71,7 ± 6,1	68,2 ± 3,3

Tabelle 3: Bindung verschiedener Substanzen an Kaninchenplasma nach Erzeugung einer akuten Niereninsuffizienz mit subkutaner Glycerininjektion (Gruppeneinteilung s. Text)

Bei den Tieren, welchen Glycerin injiziert wurde, konnten wir nur bei denjenigen Tieren, die daraufhin eine Niereninsuffizienz entwickelten, vergleichbare Effekte wie beim Uranylnitrat feststellen, nämlich eine Erhöhung des freien Anteils bei den sauren Substanzen Warfarin und Phenytoin. Keine Änderung zeigte sich beim Chinidin, während beim Propranolol wiederum eine Abnahme des freien Anteils auftrat.

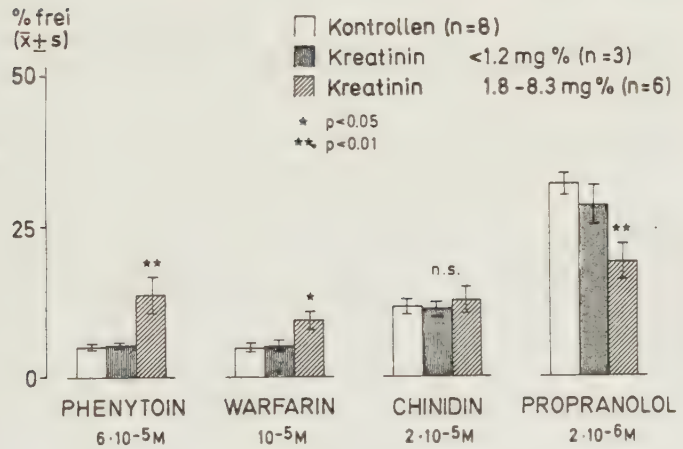


Abb. 7: Bindung von Pharmaka an Blutplasma von Kaninchen, denen Glycerin injiziert wurde, verglichen mit der Kontrollgruppe. Dargestellt ist der freie Anteil. Unter dem Substanznamen ist die verwendete Ausgangskonzentration angegeben.

s = Standardfehler, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. = nicht signifikant.

3.3. Nephrektomierte Tiere

Bei den nephrektomierten Tieren stiegen die harnpflichtigen Substanzen Kreatinin und Harnstoff in den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff stark an, erreichten zwischen dem ersten und dritten Tag einen Höchstwert, um in den folgenden Tagen wieder abzusinken (siehe Abb. 8: Harnstoff und Abb. 9: Kreatinin).

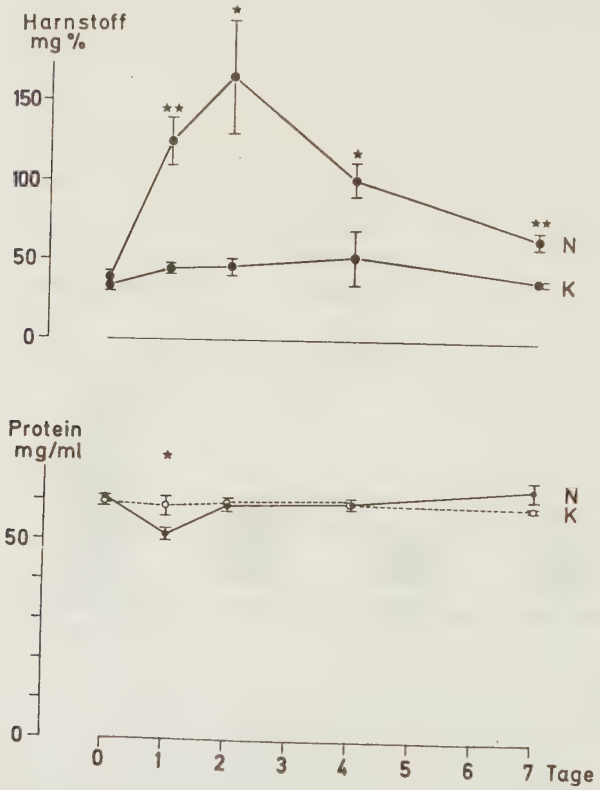


Abb. 8: *Verlauf der Harnstoff- und Proteinkonzentrationen im Plasma bei operierten Kaninchen. N = 5/6-nephrektomiert (n = 5), K = Kontrollgruppe, scheinoperiert (n = 5). Aufgetragen sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler. * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$; ** = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,01$.*

Bei der scheinoperierten Kontrollgruppe hingegen unterscheiden sich die postoperativ gemessenen Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Plasma zu keinem Zeitpunkt signifikant vom Ausgangswert. Die Kontrollgruppe zeigte keine Anzeichen einer Niereninsuffizienz.

Die Proteinkonzentration im Blutplasma blieb bei den scheinoperierten Tieren unverändert bei 59 $\pm$ 2 mg/ml. Bei den nephrektomierten Tieren hingegen stellten wir am ersten postoperativen Tag eine auf 51,3 $\pm$ 1,3 mg/ml gesunkene Proteinkonzentration fest. Dieser Meßwert unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Dieser Unterschied bestand jedoch vom zweiten postoperativen Tag an nicht mehr (siehe Abb. 8).

In beiden Versuchsgruppen wurde jeweils am ersten, zweiten, vierten und siebten Tag die Plasmaproteinbindung zweier Substanzen bestimmt. Wir wählten dazu Phenytoin, ein Beispiel für eine schwache Säure und Propranolol, ein Beispiel für eine schwache Base aus. Die Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Bindung von Phenytoin. Im unteren Teil des Bildes ist im Vergleich dazu die Kreatininkonzentration im Plasma aufgetragen. Der freie Anteil des Phenytoins steigt nach der Operation steil an und erreicht etwa die doppelte Höhe der Ausgangskonzentration bereits am ersten postoperativen Tag. In den nachfolgenden Tagen sinkt der Mittelwert des freien Anteils wieder ab und nähert sich dem Ausgangswert an. In der Kontrollgruppe hingegen ändert sich der freie Anteil des Phenytoins nicht signifikant vom Ausgangswert. Aus der Abbildung 9 ist ersichtlich, daß die Änderung des freien Anteils von Phenytoin weitgehend parallel zur Änderung der Kreatininkonzentration im Plasma erfolgt.

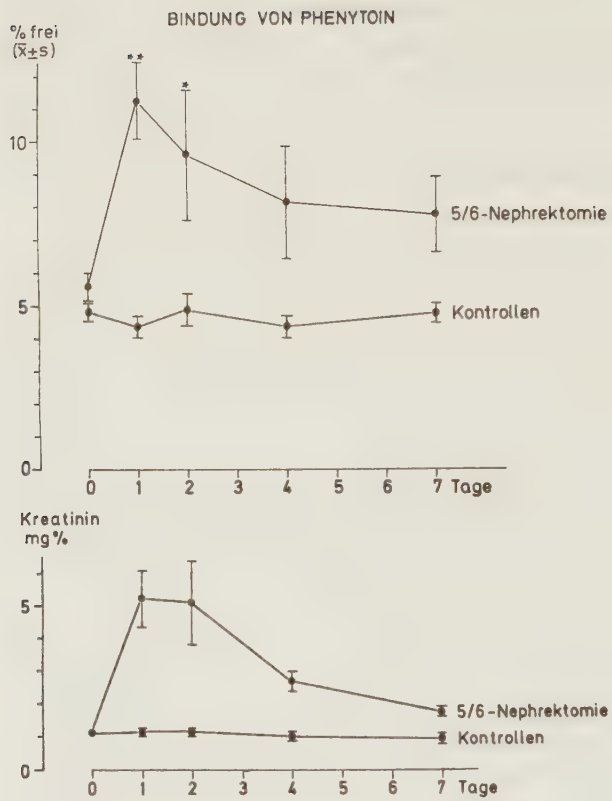


Abb. 9: *Verlauf der Bindung von Phenytoin (oberer Teil) und der Kreatininkonzentration (unterer Teil) im Plasma 5/6-nephrektomierter (n = 5) und scheinoperierter Kontrolltiere (n = 5). Auf getragen sind Mittelwert und Standardfehler. ** = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,01$, * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$.*

Die Abb. 10 zeigt den Verlauf der Bindung von Propranolol. Wegen der starken interindividuellen Unterschiede

in der Plasmaproteinbindung von Propranolol wurden die gemessenen Ausgangswerte vor der Operation gleich Null gesetzt: Die Abbildung zeigt die Bindungsänderung, ausgehend vom Ausgangswert. Der freie Anteil von Propranolol sank bei den nephrektomierten Kaninchen, aber auch bei den scheinoperierten Tieren nach der Operation steil ab. Im weiteren Verlauf der ersten postoperativen Woche stieg er bei den kontrolloperierten Tieren früher wieder an als bei den nephrektomierten Tieren.

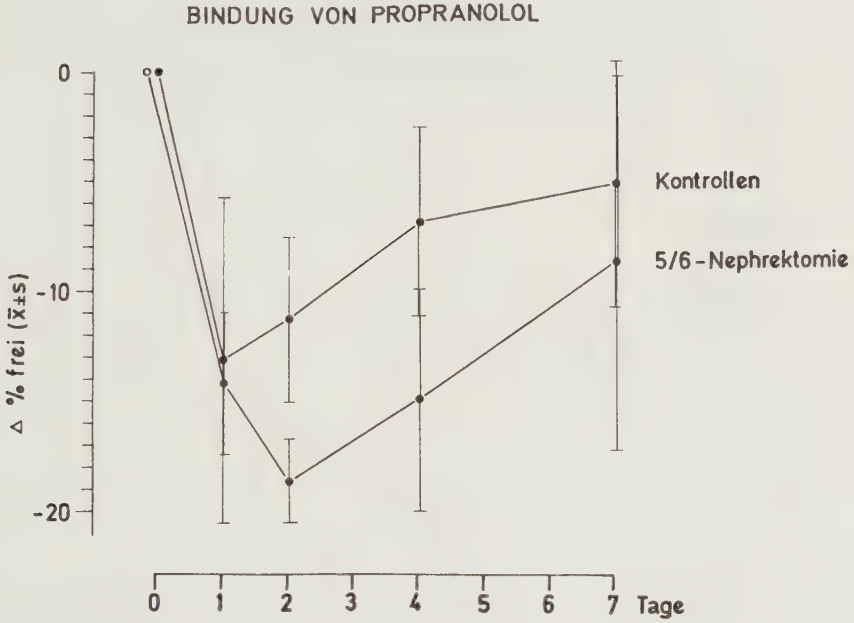


Abb. 10: Verlauf der Plasmaproteinbindung von Propranolol bei 5/6-nephrektomierten Kaninchen (n = 5) und der scheinoperierten Kontrollgruppe (n = 5). Aufgetragen ist auf der Ordinate die Abnahme des freien Anteils (Mittelwert und Standardfehler).

Jedoch unterscheiden sich die Mittelwerte nicht signifikant voneinander. In der Abbildung 11 ist der Verlauf der Bindung von Propranolol in drei Einzelbeispielen dargestellt.
Das Tier Nummer 78 (in der Mitte) ist ein nephrektomiertes Versuchstier. In den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff steigt die Kreatininkonzentration im Plasma stark an, um sich in den folgenden Tagen wieder zu normalisieren. In dieser Phase sinkt auch der freie Anteil von Propranolol vorübergehend ab. Bei No. 97 handelt

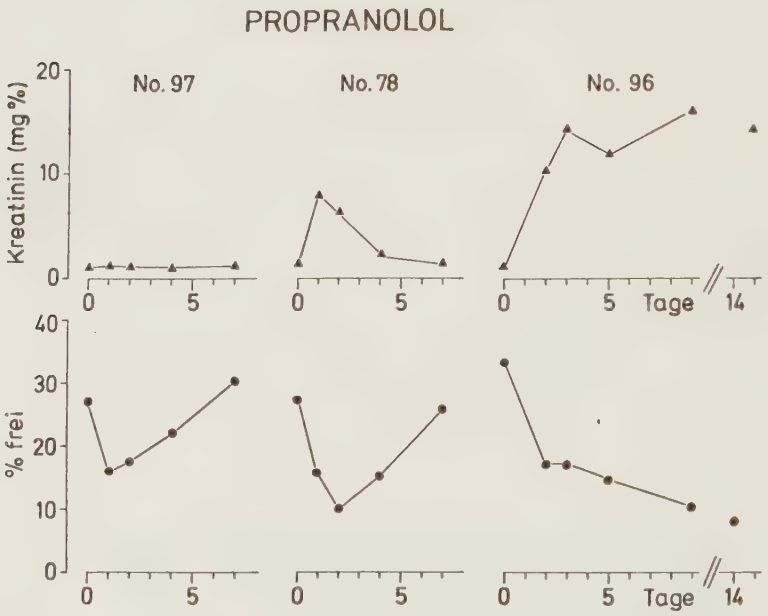


Abb. 11: Verlauf der Bindung von Propranolol im Plasma operierter Kaninchen in drei Beispielen mit den dazugehörenden Kreatininkonzentrationen im Plasma

es sich um ein scheinoperiertes Versuchstier. Obwohl dieses Tier keine Anzeichen einer Niereninsuffizienz entwickelte, findet sich ein -- wenn auch geringerer-- Abfall des freien Anteils von Propranolol. Bereits am zweiten postoperativen Tag steigt der freie Anteil wieder an und hat bis zum Ende der ersten Woche den Ausgangswert wieder erreicht. Bei Nummer 96 (rechts in der Abb. 11) handelt es sich um ein nephrektomiertes Versuchstier. Bei diesem Kaninchen stieg die Plasmakreatininkonzentration in den ersten Tagen nach der Operation an und blieb über einen Zeitraum von 14 Tagen erhöht: Es hatte sich eine irreversible akute Niereninsuffizienz entwickelt. Parallel dazu fand sich eine persistierende Verminderung des freien Anteils von Propranolol.

3.4. Weitere Untersuchungen

3.4.1. Abhängigkeit der Bindung vom Grad der Niereninsuffizienz

Es wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen der erzielten Bindungsänderung und dem Schweregrad der Niereninsuffizienz, gemessen an Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma besteht. Für diese Vergleiche wurden Phenytoin, ein Beispiel für eine schwache organische Säure und Propranolol, ein Beispiel für eine schwache organische Base gewählt.
Abb. 12 zeigt die Korrelation zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und den Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Plasma zunächst bei den mit Glycerin behandelten Tieren.

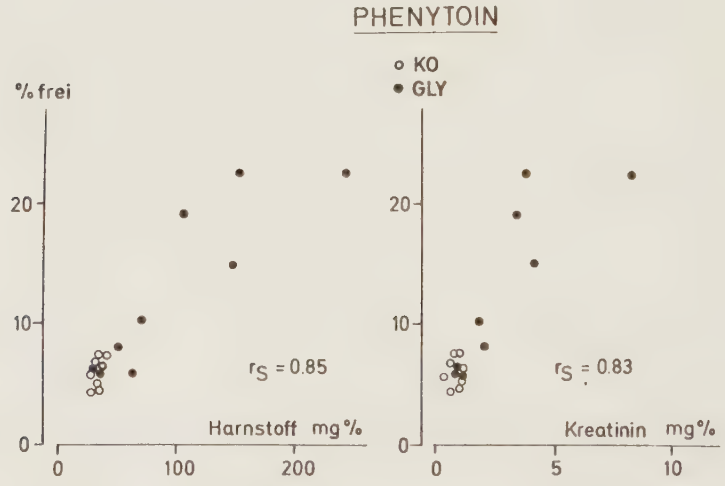


Abb. 12: Erhöhung des freien Anteils von Phenytoin bei glycerinbehandelten Kaninchen (GLY) in Abhängigkeit der Harnstoff- (links) und der Kreatininkonzentrationen (rechts) im Plasma. KO = mit isotoner Kochsalzlösung behandelte Kontrollgruppe. r_S = SPEARMANscher Rangkorrelationskoeffizient.

Beim Vergleich des freien Anteils von Phenytoin mit der Harnstoffkonzentration im Plasma erhält man einen Korrelationskoeffizienten $r_s = 0,85$, bzw. mit der Kreatininkonzentration $r_s = 0,83$. Diese Korrelationskoeffizienten sind signifikant von Null verschieden ($p < 0,01$).

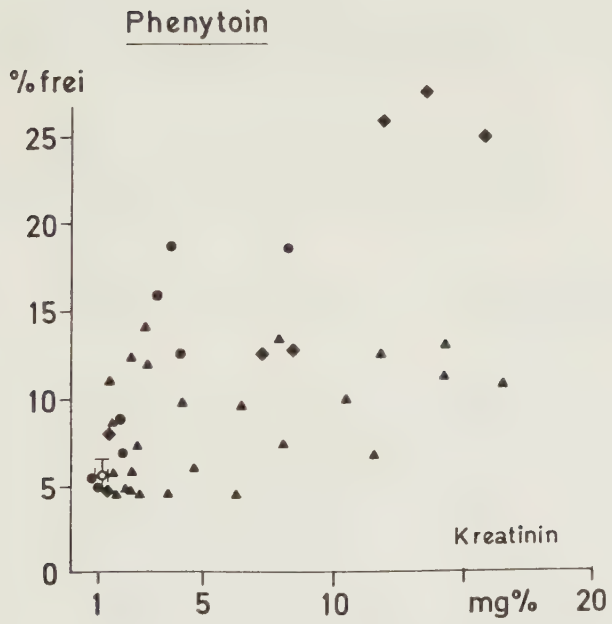


Abb. 13: *Plasmaproteinbindung von Phenytoin, dargestellt als freier Anteil, in Abhängigkeit von der Kreatininkonzentration im Plasma.*

- ● *mit Glycerin behandelte Tiere*
- ◆ *mit Uranylnitrat behandelte Tiere*
- ▲ *5/6-nephrektomierte Tiere*
- o *nicht insuffiziente Kontrolltiere (Mittelwert und Standardfehler; n = 15)*

Abb. 13 zeigt den Vergleich der Bindung von Phenytoin mit der Kreatininkonzentration im Plasma bei Kaninchen. Die Versuchsergebnisse aller drei Behandlungsmethoden wurden zusammengefaßt dargestellt, wobei die verschiedenen Gruppen durch unterschiedliche Symbole dargestellt sind. Die errechneten Korrelations- und Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: *Zusammenfassung statistischer Daten des Vergleichs der Kreatininkonzentration in Plasma mit dem freien Anteil des Phenytoins bei einer Ausgangskonzentration vor Dialyse von 6 x 10^{-5} Mol/l.*

	Glycerin-behandlung	Uranylnitrat-behandlung	5/6-Nephrektomie
Anzahl n	9	7	25
Regressions-koeffizient	2,09	1,59	0,292
Korrelations-koeffizient r	0,841	0,942	0,421
Irrtumswahrscheinlichkeit für r	< 0,005	< 0,005	< 0,025

Somit errechnen sich folgende Regressionsgeraden:

1. für die mit Glycerin behandelten Tiere:

$$\% \text{ frei} = 4{,}74 + 2{,}09 \times c_{Kr}$$

2. für die mit Uranylnitrat behandelten Tiere:

$$\% \text{ frei} = 3{,}15 + 1{,}59 \times c_{Kr}$$

3. für die 5/6-nephrektomierten Tiere:

$$\% \text{ frei} = 6{,}88 + 0{,}292 \times c_{Kr}$$

wobei % frei der freie Anteil von Phenytoin und c_{Kr} die Konzentration von Kreatinin im Plasma in mg% ist.

Auch beim Propranolol, dessen freier Anteil im Gegensatz zum Phenytoin bei Niereninsuffizienz abnahm, ergab sich bei den mit Glycerin und den mit Uranylnitrat behandelten Tieren eine gute Korrelation zur Plasmakreatininkonzentration mit einem Rangkorrelationskoeffizienten $r_s = - 0{,}927$ (Abb. 14).

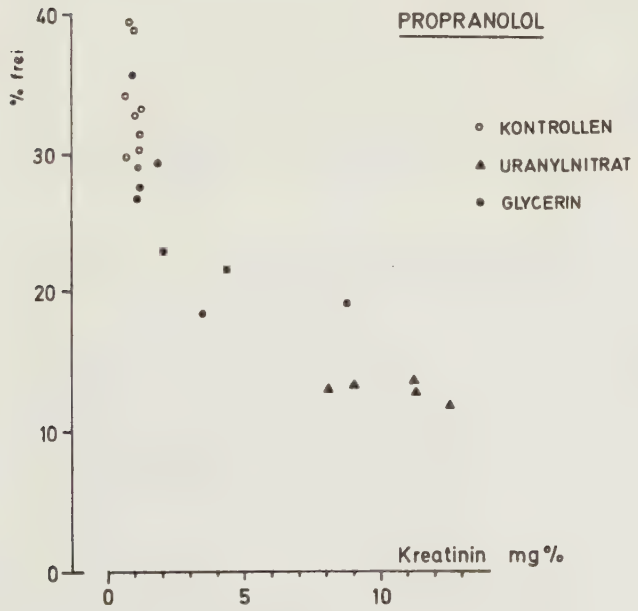


Abb. 14: Vergleich des freien Anteils von Propranolol mit der Plasmakreatininkonzentration bei Kaninchen, die entweder mit Glycerin oder mit Uranylnitrat behandelt wurden.

Die nephrektomierten Tiere sind hier nicht dargestellt, da bei ihnen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem freien Anteil und der Plasmakreatininkonzentration gefunden wurde.

3.4.2. Einfluß von Kreatinin, Harnstoff und Uranylnitrat auf die Bindung von Propranolol in vitro

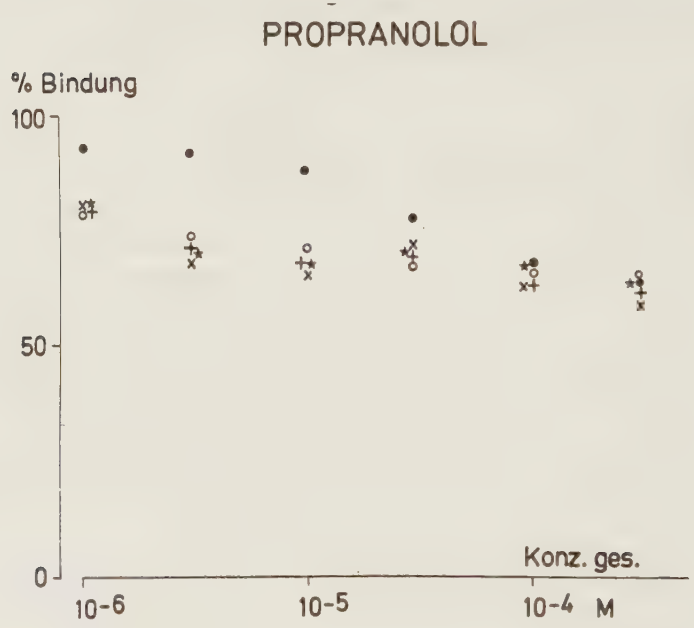


Abb. 15: Bindung von Propranolol bei verschiedenen Propranololkonzentrationen im Plasma.
- ● = niereninsuffiziente Tiere nach Behandlung mit Uranylnitrat
- ○ = Kontrollgruppe ohne Zusatz
- x = Kontrollgruppe mit Zusatz von Kreatinin in vitro (20 mg%)
- \+ = Kontrollgruppe mit Zusatz von Harnstoff in vitro (1000 mg%)
- ★ = Kontrollgruppe mit Zusatz von Uranylnitrat in vitro (10 mg%)

Der Zusatz von Kreatinin, Harnstoff oder Uranylnitrat in vitro (siehe 2.3.1.) zum Blutplasma nichtinsuffizienter Kontrolltiere änderte die Bindung von Propranolol bei keiner der verwendeten Konzentrationen (Abb. 15). Zum Vergleich sind in Abb. 15 die Bindungswerte der mit Uranylnitrat behandelten Tiere aufgetragen (Mittelwerte von 5 Tieren).

Außerdem wird in Abb. 15 sichtbar, daß die Bindung von Propranolol im verwendeten Konzentrationsbereich nicht konstant ist: Sie nimmt bei den insuffizienten Tieren mit steigender Konzentration des zugesetzten Propranolols stärker ab als bei den nicht insuffizienten Kontrollen.

3.4.3. Bindung von Propranolol nach Extraktion des Plasmas mit Aktivkohle

Die Behandlung des Plasmas einiger Tiere, die nach Uranylnitratbehandlung eine Niereninsuffizienz entwickelten, mit Aktivkohle (siehe 2.3.2.) konnte die Bindung von Propranolol nicht beeinflussen. Bei einer Gesamtkonzentration $c = 2 \times 10^{-6}$ Mol/l lag die Bindung von Propranolol vor der Aktivkohlebehandlung bei 92,3 $\pm$ 0,7 %, nach Aktivkohlebehandlung bei 92,0 $\pm$ 1,2 %.

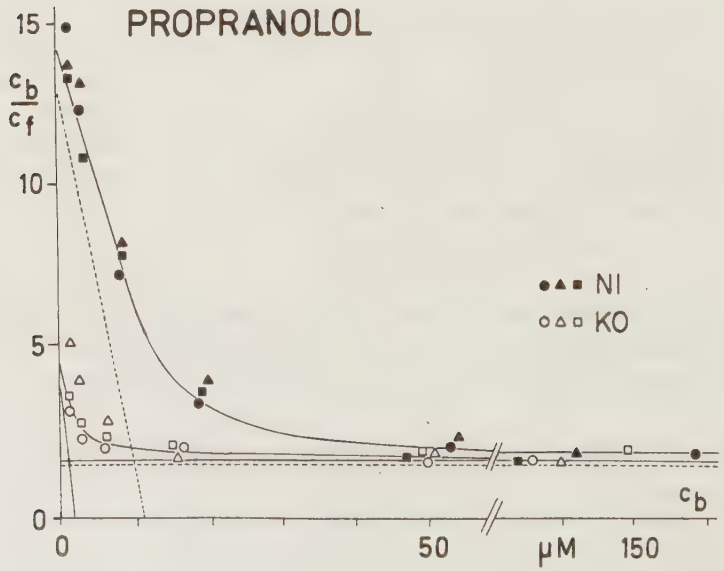
Auch in der nicht insuffizienten Kontrollgruppe bewirkte die Behandlung mit Aktivkohle keine Änderung der Bindung. Sie lag mit 69,6 $\pm$ 2,8 % nach wie vor deutlich niedriger als bei den niereninsuffizienten Tieren.

3.4.4. Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Pharmakons

Die Messung von gebundener und freier Konzentration bei unterschiedlichen Gesamtkonzentrationen erlaubt weitere Schlüsse über die Bindungsstellen der im Blutplasma enthaltenen Proteine. Die folgenden Abbildungen sind sog. Scatchard- oder Rosenthaldarstellungen (siehe 2.2.4.).

Wir untersuchten die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Pharmakons beim Propranolol (Abb. 16), beim Chinidin (Abb. 17), beim Diazepam (Abb. 18) und beim Phenytoin (Abb. 19). Bei einer Gruppe von Kaninchen wurde eine akute Niereninsuffizienz mit Uranylnitrat erzeugt, während die andere Gruppe mit isotoner Kochsalzlösung behandelt wurde (siehe 2.1.2.).

Abb. 16: Scatcharddarstellung der Bindung von Propranolol. c_b = gebundene Konzentration, c_f = freie Konzentration. NI = niereninsuffiziente Tiere, KO = nicht insuffiziente Kontrollen.



Tab. 5: Bindungsparameter für Propranolol $c_b max$ = Bindungskapazität, K = Assoziationskonstante

	niereninsuffiziente Tiere	nicht insuffiziente Kontrollen
$c_b max_1$	$1{,}174 \times 10^{-5}$ Mol/l	$2{,}806 \times 10^{-6}$ Mol/l
K_1	$1{,}082 \times 10^{6}$ l/Mol	$5{,}112 \times 10^{5}$ l/Mol
$K_2 \times c_b max_2$	1,631	1,770

Beim Propranolol (Abb. 16 und Tab. 5) unterscheidet sich die Bindung zwischen insuffizienten und nicht insuffizienten Kaninchen im Bereich der niedrigen Konzentrationen am stärksten, was auch an den errechneten Bindungsparametern $c_b max_1$ und K_1 deutlich wird. Die errechneten Asymptoten (siehe 2.2.4., Gl. 7) wurden eingezeichnet. Die Steigung dieser Asymptoten ist gleich der negativen Bindungsaffinität, während ihr Schnittpunkt mit der Abszisse die Bindungskapazität darstellt. Im Bereich höherer Konzentrationen werden die Bindungsunterschiede geringer; die errechneten Asymptoten laufen parallel zur Abszisse. In diesem Fall stellt das Produkt $K_2 \times c_b max_2$ den Achsenabschnitt der Asymptote auf der Ordinate dar (siehe 2.2.4., Gl. 8).

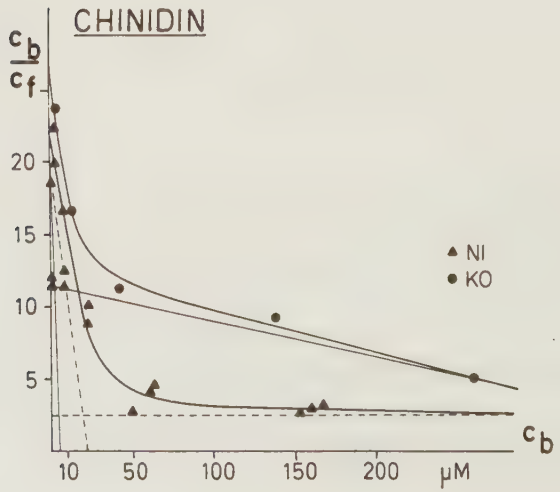
Im Gegensatz zum Propranolol zeigen sich beim Chinidin im Bereich niedriger Konzentrationen zwischen $c_b = 1 \times 10^{-6}$ Mol/l und $c_b = 3 \times 10^{-5}$ Mol/l keine signifikanten Unterschiede zwischen der insuffizienten Gruppe und der Kontrollgruppe (vgl. 3.2.). Deutliche Unterschiede zeigen sich beim Chinidin jedoch bei höheren Konzentrationen zwischen $c_b = 5 \times 10^{-5}$ Mol/l und $c_b = 1{,}5 \times 10^{-4}$ Mol/l. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens von Chinidin bei noch höheren Konzentrationen war

wegen der begrenzten Löslichkeit des Chinidins nicht möglich.

Tab. 6: Bindungsparameter für Chinidin $c_b max$ = Bindungskapazität, K = Assoziationskonstante

	niereninsuffiziente Tiere	nicht insuffiziente Kontrollen
$c_b max_1$	$2{,}314 \times 10^{-5}$ Mol/l	$5{,}830 \times 10^{-6}$ Mol/l
K_1	$6{,}978 \times 10^{7}$ 1/Mol	$2{,}825 \times 10^{6}$ 1/Mol
$c_b max_2$	---	$4{,}720 \times 10^{-4}$ Mol/l
K_2	---	$1{,}961 \times 10^{-4}$ 1/Mol
$K_2 \times c_b max_2$	1,978	---

Abb. 17: Scatcharddarstellung der Bindung von Chinidin c_b = gebundene Konzentration, c_f = freie Konzentration. NI = niereninsuffziente Tiere (n = 3), KO = nichtinsuffiziente Kontrollen (n = 5, nur die Mittelwerte sind dargestellt.) Die errechneten Bindungsparameter aus Tab. 6 sind in Form der Asymptoten dargestellt.



Beim Diazepam (Abb. 18) zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung im angewendeten Meßbereich. Die Bindung (in der Scatcharddarstellung als c_b/c_f ablesbar) war bei den niereninsuffizienten Kaninchen im gesamten Konzentrationsbereich gegenüber den Kontrollen vermindert. Die errechneten Regressionsgeraden sind eingezeichnet; sie verlaufen parallel zur Abszisse. Die Bindungsstellen sind damit in dem von uns untersuchten Konzentrationsbereich nicht sättigbar und der Achsenabschnitt auf der Ordinate entspricht dem Produkt K x $c_b$max (vgl. 2.2.4., Gl. 8).

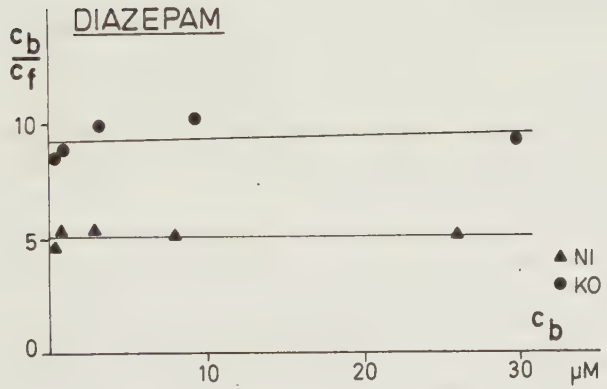


Abb. 18: Scatcharddarstellung der Bindung von Diazepam. c_b = gebundene Konzentration, c_f = freie Konzentration, NI = niereninsuffiziente Tiere (n = 5), KO = nichtinsuffiziente Kontrollen (n = 5). Für jede angewendete Konzentration wurde der berechnete Mittelwert eingetragen.

Beim Phenytoin war die Bindung bei den niereninsuffizienten Kaninchen ebenfalls im angewendeten Meßbereich gegenüber den Kontrollen vermindert (Abb. 19). Die errechneten Regressionsgeraden sind wiederum eingezeichnet. Bei den niereninsuffizienten Tieren verläuft die Regressionsgerade parallel zur Abszisse, doch auch bei der Kontrollgruppe ist die Steigung der Regressionsgeraden nicht signifikant von Null verschieden. Damit ließ sich auch beim Phenytoin keine Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Pharmakons nachweisen. Wie beim Diazepam ist ebenfalls das Produkt K x $c_b max$ bei Niereninsuffizienz vermindert.

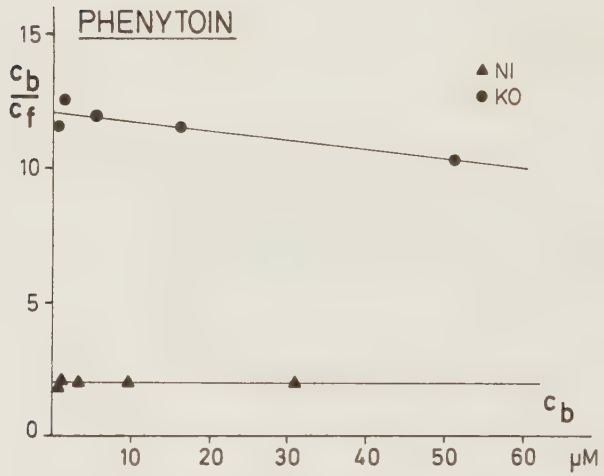


Abb. 19: Scatcharddarstellung der Bindung von Phenytoin. c_b = gebundene Konzentration, c_f = freie Konzentration, NI = niereninsiffiziente Tiere (n = 5), KO = nichtinsuffiziente Kontrollen (n = 5). Für jede angewendete Konzentration wurde der berechnete Mittelwert eingetragen.

4. DISKUSSION

4.1. Akutes Nierenversagen beim Menschen und im tierexperimentellen Modell

Akutes Nierenversagen im engeren Sinne bedeutet einen plötzlichen reversiblen Ausfall der Nierenfunktion, bedingt durch eine von der Niere unabhängige Erkrankung. Im weiteren Sinne umfaßt das akute Nierenversagen auch einen plötzlichen Ausfall der Nierenfunktion durch Erkrankungen der Niere selbst oder durch Obstruktion der ableitenden Harnwege (SIEBERTH 1977).

Je nach Ort der Entstehung läßt sich das akute Nierenversagen nach prärenalen, renalen oder postrenalen Ursachen einteilen. Prärenale Ursachen, z.B. Schock und schwere Hypotension, Hämolyse, Myolyse, Infekte und Intoxikationen sind bei menschlichen Patienten die häufigsten Ursachen (TRUNIGER 1980). Zu den renalen Ursachen zählen Nierenerkrankungen und chirurgische Eingriffe, die zu einer Verminderung von funktionstüchtigem Nierengewebe führen, während Störungen von Ureter und Blase, wenn sie zum Nierenversagen führen, als postrenale Ursachen zusammengefaßt werden.

Unabhängig von der Ursache zeigt der Verlauf des reversiblen, akuten Nierenversagens vier charakteristische Stadien: das Initialstadium, in dem die auslösende Ursache im Vordergrund der Symptomatik steht, das oligo-anurische Stadium, das polyurische Stadium und schließlich die Restitution. Die Entwicklung des charakteristischen oligo-anurischen Stadiums geht mit einer verminderten Durchblutung der Nierenrinde einher, die mit einer Drosselung der vasa afferentia durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems erklärt wird (BUCHBORN 1976, HOLLENBERG et al. 1970).

Zur Erzeugung einer experimentellen Niereninsuffizienz am Tier sind ebenso prärenale, renale und postrenale Methoden bekannt, die funktionell an unterschiedlichen Orten des Organismus angreifen. Wir erzeugten eine experimentell ausgelöste Niereninsuffizienz an Kaninchen durch drei verschiedene Methoden, von denen sich zwei, nämlich die Injektion von Glycerin sowie von Uranylnitrat, zu den prärenalen und eine, nämlich die subtotale Nephrektomie, zu den renalen Ursachen zählen lassen.

4.1.1. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch subkutane Glycerininjektion

Während der Begriff " akutes Nierenversagen " sich in der Literatur erst seit etwa 20 Jahren allgemein durchgesetzt hat (z.B. SARRE und ROTHER 1962), finden wir Beschreibungen der subkutanen Injektion von Glycerin schon früher (CAMUS et PAGNIEZ 1902). Dieses Verfahren sollte im tierexperimentellen Modell dem sogenannten " Muskelzertrümmerungssyndrom " des Menschen entsprechen, das nach umfangreichen Weichteilverletzungen auftritt und in der Folge nicht nur zur Myolyse, sondern auch zur Hämolyse mit Ausscheidung von Hämoglobin führt.
Bei der Suche nach dem genauen Wirkungsmechanismus stellten verschiedene Autoren fest, daß die nach Glycerininjektion auftretende Anurie nicht obligatorisch mit der Hämolyse oder Myoglobinurie verbunden ist (GOORMAGHTIGH 1947, CAMERON a. FINCK 1956, KOSLOWSKY 1959, FINCK 1959, ROTHER 1965). Bereits GOORMAGHTIGH (1947) folgerte, daß nach einer subkutanen Glycerininjektion im Gewebe eine Substanz freigesetzt werden müsse, die an verschiedenen Stellen des Organismus zytotoxisch wirkt und dabei auch die Niere schädigt.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei Niereninsuffizienz nach Glycerininjektion die Durchblutung der Niere vermindert ist, während der arterielle Blut-

druck im Normbereich bleibt (FINCK 1965).
Der Blutdruck ist in der Nierenrinde, in der sich die Glomeruli befinden, stärker reduziert als im Nierenmark. AYER et al. (1971) errechneten, daß der glomeruläre Perfusionswiderstand um den Faktor 18,9 gestiegen war und der glomeruläre Perfusionsdruck auf 19,3 mm Hg vermindert, einen Wert, der unter dem onkotischen Druck des Plasmas liegt. Ayer schloß daraus, daß eine primäre Tonuserhöhung der afferenten Arterien zu einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate führt. Perfusionsszintigraphische Untersuchungen am Menschen stellten Veränderungen der glomerulären Filtrationswerte bei akutem Nierenversagen fest, die denen nach subkutaner Glycerininjektion vergleichbar sind (AYER et al. 1971, STEIN et al. 1978). Die subkutane Glycerininjektion am Tier ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Modell für akutes Nierenversagen prärenaler Ursache beim Menschen.

4.1.2. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat

Nach einmaliger Gabe von Uranylnitrat kommt es beim Kaninchen schnell zu einem etwa 2 bis 3 Wochen anhaltenden Anstieg der Reststickstoff- und Kreatininkonzentrationen (HAYMAN et al. 1939). Das zunächst auffälligste klinische Symptom ist eine nach 2 bis 3 Tagen einsetzende Polyurie mit Proteinurie, die auf glomeruläre Schäden zurückgeführt wird (ROTHER 1965). Sie geht jedoch schnell in Oligurie und schließlich Anurie über. FLAMENBAUM et al. (1974) stellten 6 Stunden nach Applikation von Uranylnitrat eine auf 67 % gesunkene glomeruläre Filtrationsrate fest. Nach 48 Stunden war die renale Durchblutung auf 28 % und die glomeruläre Filtrationsrate auf 26 % gefallen. Perfusionsszintigraphisch zeigt sich eine progressive, fleckige Nierenrindenischämie, wie sie auch von AYER et al. (1971) nach Glycerininjektion festgestellt wurde. Vergleichbare hämo-

dynamische Veränderungen wurden bei menschlichen Patienten mit akutem Nierenversagen aund auch bei anderen tierexperimentellen Modellen gefunden (STEIN et al. 1978).
Obwohl der Mechanismus zur Entstehung einer akuten Niereninsuffizienz durch Uranylnitrat nicht vollständig geklärt ist, kann man annehmen, daß auch dieses experimentelle Modell dem akuten Nierenversagen prärenaler Ursache beim Menschen entspricht.

4.1.3. Erzeugung einer Niereninsuffizienz durch subtotale Nephrektomie

Operative Methoden werden sowohl zur Erzeugung einer akuten als einer chronischen Niereninsuffizienz benutzt. ORMROD a. MILLER (1980) beschreiben die Erzeugung von Niereninsuffizienz bei Ratten durch partielle Nephrektomie. In diesem Modell ist der Schweregrad der Niereninsuffizienz vom Ausmaß des Gewebeverlustes abhängig. Allerdings führte er die Nephrektomie in zwei getrennten Sitzungen durch. Bei der ersten Operation wurde die erste Niere verkleinert und bei einer Nachoperation eine Woche später die zweite, bisher ungeschädigte Niere entfernt. Die Niereninsuffizienz trat erst nach dieser zweiten Operation ein. Die subtotale Nephrektomie, häufig als 5/6-Nephrektomie bezeichnet, läßt jedoch nach GIACOMINI et al. (1981) in einer einzigen Sitzung mit angeblich besser reproduzierbaren Ergebnissen durchführen.
Wir entfernten unseren Versuchstieren in einer Sitzung eine Niere ganz und verkleinerten die zweite Niere auf ungefähr ein Drittel der ursprünglichen Größe. Diese 5/6-Nephrektomie in einer Sitzung führte bei unseren Versuchstieren zu einer unmittelbar nach der Operation einsetzenden akuten Niereninsuffizienz. Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen stiegen postoperativ steil an, um in einer nachfolgenden Erholungsphase bis zum Ende der ersten Woche auf mäßig erhöhte Werte abzufallen.

Bei unseren Versuchen war die Überlebensrate in der nephrektomierten Gruppe nicht signifikant schlechter als in der Kontrollgruppe: von 14 nephrektomierten Tieren starben 2 Tiere innerhalb der ersten Woche bei stark erhöhten Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen, von den 14 scheinoperierten Tieren jedoch starb eines unter den Zeichen einer Peritonitis.

Die entstandene akute Niereninsuffizienz in der ersten Woche ist nicht allein durch den Gewebsverlust infolge der Operation zu erklären, denn ORMROD erzielte bei seinem Vorgehen in zwei Sitzungen derartige Effekte nicht. Der schnelle und hohe Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen läßt vermuten, daß das verbliebene Restnierengewebe im Laufe der Operation akut geschädigt wurde und erst nach einer Erholungspause von einigen Tagen seine Funktion wieder aufnehmen kann. Für diese akute Schädigung könnte die etwa 20 Minuten anhaltende Ischämie durch Abklemmen der Nierenarterie mit verantwortlich sein.

Bei den scheinoperierten Kontrolltieren in unseren Versuchen wurden beide Nierenarterien ebenfalls 20 Minuten abgeklemmt. Diese Tiere zeigten jedoch keinen oder nur einen geringfügigen Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen. Wir müssen deshalb annehmen, daß die kurzzeitige Ischämie über 20 Minuten allein noch keine akute Niereninsuffizienz auslösen konnte und auch der Gewebeverlust durch die 5/6-Nephrektomie für sich allein nicht. Darauf deuten zumindest die Beobachtungen hin, daß bei 5/6-Nephrektomie in zwei Sitzungen die Ergebnisse schlecht reproduzierbar seien (GIACOMINI et al. 1981). Erst die Kombination aus beiden Effekten löst akutes, reversibles Nierenversagen aus, das mit dem akuten Nierenversagen renaler Ursache beim Menschen gute Übereinstimmung zeigt.

4.2. Interpretation der Kreatinin-, Harnstoff- und Proteinkonzentrationen im Plasma

Die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma werden häufig zur Messung der Nierenfunktion herangezogen. Beides sind harnpflichtige Substanzen, die von der Niere ausgeschieden werden müssen. Während die Produktion von Kreatinin als konstant gilt, ist die körpereigene Produktion von Harnstoff abhängig von der Eiweißzufuhr, dem Katabolismus und der renalen Ausscheidung (KUHLMANN 1980). Da der laborchemische Nachweis von Kreatinin durch andere Substanzen gestört werden kann, haben wir jedoch den Harnstoffgehalt im Plasma als Kontrolle mitgemessen.

Zwischen der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration zeigte sich jedoch bei unseren Versuchen eine gute Korrelation (vgl. Abb. 3,6,8 und 9). Zu diesem Ergebnis kamen auch GIACOMINI et al. (1981), die die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen bei 5/6-nephrektomierten und uranylnitratbehandelten Ratten untersuchten.

Bei den 5/6-nephrektomierten Tieren stieg in unseren Versuchen die Harnstoffkonzentration erst am zweiten Tag auf den Maximalwert an, während die Kreatininkonzentration bereits am ersten Tag ihren höchsten Wert hatte. Diese Abweichung hängt möglicherweise mit dem gesteigerten Katabolismus aufgrund fehlender Nahrungszufuhr zusammen, denn unsere nephrektomierten Kaninchen zeigten in den ersten Tagen nach der Operation fast völlige Nahrungskarenz. Da bei einer solchen Nahrungskarenz zuerst schnell verfügbare Glykogenreserven in der Leber abgebaut werden, bevor es zu einem nennenswerten Eiweißkatabolismus kommt, ist ein prolongierter Anstieg der Harnstoffplasmakonzentration erklärbar.

Bei leichteren Formen der Niereninsuffizienz gilt die Kreatininkonzentration im Plasma nicht als gutes Maß für die Nierenfunktion, denn ein Kreatininanstieg wird erst bei Einschränkung des Glomerulumfiltrats auf 30-50 %

der Norm betrachtet (KUHLMANN 1980). Zur Erfassung mäßiggradiger Einschränkungen der Niereninsuffizienz gilt die Kreatininclearance als besserer Parameter. Wir führten die Messung der Kreatininclearance versuchsweise bei einer Gruppe von Kaninchen durch, indem wir die Kaninchen in Käfige setzten, die das Sammeln von Urin erlaubten. Die Gewinnung von Sammelurin über 24 Stunden war jedoch mit großen Fehlern behaftet, da die Spontanentleerung der Harnblase zu unregelmäßigen Zeiten erfolgte. Auch mit einer Sammelzeit von 48 Stunden erhielten wir keine befriedigenden Ergebnisse. Längere Sammelperioden erschienen uns nicht sinnvoll, da die akute, reversible Niereninsuffizienz beim Kaninchen nur wenige Tage dauert. Von einer Harnblasenpunktion oder ähnlichen, eingreifenden Maßnahmen wurde abgesehen.

Die Proteinkonzentration im Plasma ist ein wichtiger Parameter bei der Messung der Proteinbindung von Pharmaka. Bei den mit Glycerin sowie den mit Uranylnitrat behandelten Tieren stellten wir mittels der BIURET-Methode keine signifikanten Änderungen fest.
Bei den nephrektomierten Tieren war der Proteingehalt des Plasmas am ersten Tag nach der Operation signifikant erniedrigt (vgl. Abb. 8). Am zweiten postoperativen Tag hatte sich der Proteingehalt der Kontrollgruppe wieder angeglichen. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Erscheinung ist eine durch die Behandlung, also iatrogen bedingte Überwässerung. Die Tiere hatten während der Operation, um einen venösen Zugang offen zu halten, jeweils 150 ml isotone Kochsalzlösung per infusionem erhalten. Diese Flüssigkeit konnte wegen der verminderten Nierenfunktion erst verzögert ausgeschieden werden. Dieser Plasmaverdünnungseffekt zeigte sich bei der Kontrollgruppe wegen der intakten Nierenfunktion am ersten postoperativen Tag nicht mehr.

4.3. Bestimmung der Proteinbindung durch Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der Proteinbindung von Pharmaka gilt heute als die genaueste Methode (CHIGNELL 1971, KURZ et al. 1977, SCHOLTAN 1978). Die möglichen Fehlerquellen sollen daher nicht ausführlich diskutiert werden.
In der o.g. Literatur werden folgende Effekte genannt, die gegebenenfalls in der Berechnung berücksichtigt werden müssen:

a) Adsorption des Pharmakons an die Dialysemembran
b) Anreicherung kationischer Pharmaka im Proteinkompartiment durch den Donnan-Effekt
c) Volumeneffekt durch das Protein
d) Metabolismus

zu a)
In unseren Versuchen verwandten wir Dialysezellen aus V_4A-Stahl mit Membranen aus regenerierter Zellulose. In Vorversuchen zeigte sich, daß einige Pharmaka zum Teil beträchtlich an Zellulosemembranen gebunden werden können. Wird die Pharmakonkonzentration nur im proteinfreien Kompartiment gemessen, so werden zu hohe Bindungswerte vorgetäuscht, falls die absorbierte Menge nicht berücksichtigt wird. Wir haben daher immer die Pharmakonkonzentration auf beiden Seiten der Membran, also c_i und c_a bestimmt. Dabei erhielten wir die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse nach Einstellung des Dialysegleichgewichts. Die Membranadsorption läßt sich abschätzen durch die Wiederfindungsrate R.

$$\% R = \frac{(c_a + c_i) \times 100 \%}{c_g}$$

In unseren Versuchen fanden wir für die Wiederfindungsrate R Werte zwischen 75 % beim Propranolol und 98 % beim Phenytoin. Bei der Berechnung der Bindung braucht R jedoch nicht berücksichtigt zu werden.

zu b)

Kolloidelektrolyte, wie Proteine, können in einem Dialysesystem zu einer unterschiedlichen Ladungsverteilung in beiden Kompartimenten führen (DONNAN-Verteilung). Das Verhältnis zwischen den Konzentrationen der frei diffusiblen Anionen (wie Chlorid- und Phosphationen) in der Außenlösung (A_a) und in der proteinhaltigen Innenlösung (A_i) ist durch den Donnan - Faktor gegeben. Dabei gilt

$$\frac{A_a}{A_i} = \sqrt{\frac{A_i + P^-}{A_i}}$$

wobei P^- die Konzentration der Protein-Anionen ist. Die Größe von P^- wird dabei im Wesentlichen durch die Ladungen des im Plasma mengenmäßig am stärksten vertretenen Proteins, nämlich des Albumins, bestimmt. Ein Albuminmolekül trägt bei pH 7,4 etwa 10 bis 20 negative Nettoladungen (SCHOLTAN 1964). Bei einer Konzentration des Albumins von ca. 4×10^{-4} Mol/l ergibt sich für P^- ein Wert von 0,004 bis 0,008. Bei hohen Konzentrationen an diffundierbaren Elektrolyten, in unserem Fall isotoner Pufferlösung mit ca. 0,4 Mol/l, kann man aus obiger Formel abschätzen, daß der Donnan-Faktor maximal Werte von 1,01 annimmt. Der Ladungsunterschied ist also maximal 1 %. Eine mögliche Anreicherung von kationischen Pharmaka im Proteinkompartiment ist somit vernachlässigbar klein.

zu c)

Bei der Bestimmung des Volumens in der Dialysekammer müßte berücksichtigt werden, daß das Volumen, in dem

sich das Pharmakon innerhalb der Dialysekammer verteilen kann, durch das Protein eingeschränkt wird. Bei einer Proteinkonzentration von 60 mg/ml ergibt sich rechnerisch eine Volumenverminderung von etwa 5 %. Da dieser Effekt jedoch dem unter b) genannten Effekt entgegengerichtet ist, verringert sich seine Bedeutung.

zu d)

Die Pharmakonbindung kann in vitro durch Biotransformation des Pharmakons, aber auch durch Autolyse der Proteine des Blutplasmas verändert sein. Da diese Einflüsse temperaturabhängig sind und bei niedriger Temperatur verzögert ablaufen, wurde die Gleichgewichtsdialyse bei Kühlraumtemperatur bei $4^{o}C$ durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Unterschiede der Bindung zwischen gesunden Versuchstieren und solchen mit experimentell erzeugter Niereninsuffizienz aufzuzeigen. Da alle genannten Effekte a) bis d) beide Gruppen von Versuchstieren betreffen, lassen sich Bindungsunterschiede damit nicht erklären.

4.4. Besprechung der Ergebnisse

4.4.1. Plasmaproteinbindung saurer Substanzen

Bei unseren Bindungsversuchen mit dem Blutplasma niereninsuffizienter Kaninchen fällt auf, daß der freie Anteil aller sauren, das heißt anionischen Substanzen, bei Niereninsuffizienz erhöht ist. Dies gilt sowohl für stark gebundene Substanzen, wie die Acetylsalicylsäure als auch für weniger stark gebundene Substanzen, wie Phenytoin, Thiopental und Pentobarbital.

Bei niereninsuffizienten Patienten läßt sich oft eine metabolische Azidose nachweisen. Eine Verschiebung des pH-Wertes im Plasma in den sauren Bereich wäre eine Erklärung für die veränderte Bindung von Pharmaka. Wir haben diesen Effekt jedoch ausgeschlossen, indem wir in allen Versuchsansätzen bei pH 7,4 gemessen haben.

Auch eine Änderung der Proteinkonzentration wäre eine denkbare Erklärung. Wir konnten jedoch keine Änderungen der Proteinkonzentration feststellen, wenn man von den nephrektomierten Tieren am ersten postoperativen Tag einmal absieht, bei denen ein iatrogener Verdünnungseffekt des Plasmas eintrat (vgl. 4.2.).

Eine weitere Erklärung ist, daß endogene Substanzen, die bei Niereninsuffizienz angereichert werden, wie zum Beispiel Harnstoff, mit den Pharmaka an ihren Bindungsstellen in Wechselwirkung treten und diese aus ihrer Bindung verdrängen. Doch bereits TAYLOR et al. (1954) konnten zeigen, daß der Zusatz von Harnstoff zum Blutplasma gesunder Kaninchen die Bindung von Thiopental nicht änderte.

Die Bindungskapazität des Plasmas wird für saure Substanzen (Salicylsäure und Warfarin) bei Verdünnung

menschlichen Plasmas größer (SJÖHOLM et al. 1975). Es müssen also vorher blockierte Bindungsstellen durch die Verdünnung frei geworden sein. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß endogen gebildete Substanzen, die bereits bei gesunden Personen bzw. gesunden Versuchstieren im Plasma in geringer Konzentration vorliegen und durch die Niere eliminiert werden, bei Niereninsuffizienz angereichert werden. Diese Substanzen werden an die gleichen Bindungsstellen gebunden wie das betroffene Pharmakon und können das Pharmakon kompetitiv verdrängen. Der freie Anteil des Pharmakons wird dadurch erhöht.

Es liegt der Schluß nahe, daß diese endogenen Substanzen durch Dialyse entfernt werden können und damit die Bindung saurer Pharmaka wieder zu normalisieren ist. Tatsächlich gelang es ANDREASEN (1974) durch vorherige Dialyse des Plamas gegen Ringer-Lösung den freien Anteil saurer Substanzen zu vermindern -- und dies sowohl bei gesunden Blutspendern als auch bei niereninsuffizienten Patienten. Die Bindungsunterschiede zwischen beiden Gruppen ließen sich indessen nicht ganz beseitigen.

Neben einer kompetitiven Verdrängung wäre eine Reduzierung der Bindung durch allosterische Mechanismen denkbar. Durch Besetzen einer Bindungsstelle auf dem Albuminmolekül könnte der Inhibitor die Tertiärstruktur des Albuminmoleküls und damit die Anordnung der Bindungsstellen für Pharmaka ändern. Durch elektrophoretische Trennung der Plasmamoleküle kamen SHOEMAN et al. (1972) zu dem Schluß, daß die verminderte Proteinbindung bei Niereninsuffizienz auf eine Strukturveränderung der Plasmamoleküle zurückzuführen sei.

Strukturveränderungen der Plasmamoleküle müssen nicht durch Neubildung anderer Proteine bedingt sein. Dies

wäre sogar unwahrscheinlich, da ein akutes Nierenversagen sich innerhalb weniger Stunden entwickeln kann und der Organismus kaum genügend Zeit hätte, seine Proteine gegen andere auszutauschen. Die von SHOEMAN et al. (1972) entdeckten Strukturveränderungen könnten auch durch die Bindung endogener Substanzen mit sehr hoher Affinität entstehen, möglicherweise sogar durch kovalente Bindung.

In den Versuchen von CRAIG et al. (1976), der Blutplasma bei pH 3,0 mit Aktivkohle behandelte, konnten die Bindungseigenschaften des Plasmas niereninsuffizienter Patienten dem Plasma gesunder Versuchspersonen wieder angeglichen werden.
CRAIG et al. nahmen an, daß es sich bei den im sauren Bereich extrahierbaren Substanzen um Fettsäuren handelt. Es ist bekannt, daß Wechselwirkungen in der Bindung mit Pharmaka an menschliches Albumin vorkommen, die sowohl kompetitives als auch nicht kompetitives Verhalten zeigen. CHAKRABARTI (1978) konnte eine solche Wechselwirkung zwischen Ölsäure und Warfarin experimentell nachweisen. Es ist jedoch fraglich, ob der bei Niereninsuffizienz vermutete Inhibitor ein einheitlicher Stoff ist, oder ob es sich um mehrere Substanzen handelt, die hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften ganz unterschiedlich sind (GRAFNETTEROVA et al. 1979, LICHTENWALNER et al. 1981, ERILL et al. 1980, KINNIBURGH a. BOYD 1981).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Patienten, die durch Hämodialyse behandelt werden müssen, eine verminderte Bindung saurer Substanzen haben, die durch die Hämodialyse nicht normalisiert werden kann. Erst eine erfolgreiche Nierentransplantation gleicht die Bindungseigenschaften des Plasmas denen von gesunden Personen an (ODAR-CEDERLÖF a. BORGA 1977).

Zusammenfassend lassen sich aus der o.g. Literatur folgende Schlüsse ziehen:

1) Albumin besitzt mehrere Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität sowohl für körpereigene als auch für körperfremde Substanzen.

2) Es können Wechselwirkungen zwischen körpereigenen Substanzen und Pharmaka sowohl mit kompetitivem als auch mit nicht kompetitivem Mechanismus auftreten.

3) Nicht durch Hämodialyse, sondern erst durch eine Nierentransplantation kann die bei Niereninsuffizienz verminderte Bindung einiger saurer Substanzen wieder normalisiert werden.

4.4.2. Plasmaproteinbindung basischer Substanzen

Die basischen, d.h. kationischen Substanzen, verhalten sich nicht entsprechend den sauren Substanzen. Bei den mit Uranylnitrat behandelten Kaninchen untersuchten wir die Bindung von fünf verschiedenen basischen Substanzen. Nur eine davon, das Diazepam, zeigte bei Niereninsuffizienz eine Erhöhung des freien Anteils, wie wir es auch bei den sauren Substanzen gesehen hatten. Bei Chlorpromazin, Chinidin und Imipramin fanden wir keine signifikante Änderung, und Propranolol zeigte gar eine Verminderung des freien Anteils.
Bei den mit Glycerin behandelten Tieren wurde die Bindung zweier basischer Substanzen bestimmt: Chinidin und Propranolol. Chinidin zeigte auch hier keine Änderung, während beim Propranolol wiederum eine Abnahme des freien Anteils auftrat.

Weil die Bindung von Propranolol offensichtlich eine Ausnahme bildet, untersuchten wir die Bindungseigenschaften von Propranolol genauer. Bei den nephrektomierten Tieren trat während der akuten Phase des Nierenversagens ebenfalls eine Verminderung des freien Anteils auf. Doch bei den scheinoperierten Kontrolltieren fanden wir auch eine Verminderung des freien Anteils, die so stark war, daß sich der Mittelwert nicht signifikant von der nephrektomierten Gruppe unterschied (vgl. Abb. 10). Bereits die Operation selbst löste eine Bindungsänderung aus, die durchaus vergleichbar mit der Bindungsänderung bei Niereninsuffizienz war.
Aus diesem Grunde konnten wir bei den operierten Tieren keine Korrelation zur Kreatininkonzentration im Plasma finden, was bei den Versuchsgruppen, die mit Glycerin oder Uranylnitrat behandelt waren, durchaus möglich war (siehe Abb. 14). Dieser Vergleich der Bindungsergebnisse beim Propranolol deutet darauf hin, daß mehrere Ursachen die Bindung von Propranolol beeinflussen können.

Wir untersuchten, ob der Zusatz von Kreatinin, Harnstoff oder Uranylnitrat zum Plasma gesunder Kaninchen die gleichen Bindungsänderungen hervorrufen kann wie das akute Nierenversagen. Wir konnten durch Zusatz dieser Substanzen jedoch gar keine Bindungsänderung erzeugen.

Auch von anderen basischen Substanzen ist bekannt, daß die Plasmaproteinbindung bei verschiedenen Krankheitszuständen, vor allem aber bei entzündlichen Krankheiten und Gewebstraumen erhöht sein kann, z.B. von Chinidin (NILSEN et al. 1975, FREMSTAD 1973, FREMSTAD et al. 1976, BELPAIRE et al. 1977 a, EDWARDS et al. 1981), von Chlorpromazin (PIAFSKY et al. 1978), oder von Desmethylimipramin (REIDENBERG et al. 1971). FREMSTAD et al. (1976) und GLASSON et al. (1979) konnten nachweisen, daß die betreffenden Pharmaka Propranolol und Chinidin nicht nur an Albumin, sondern auch in nennenswertem Maße an andere Proteine gebunden werden können, an Globuline, Lipoproteine und an sogenannte " Akute-Phase Proteine ". Diese zuletzt genannte Gruppe ist für die Bindung von Propranolol besonders wichtig: Das Akute-Phase-Protein Orosomukoid hat unter allen untersuchten Proteinen gegenüber Propranolol die höchste Bindungsaffinität bei relativ kleiner Bindungskapazität. Damit ist Orosomukoid das einzige bindende Plasmaprotein, dessen Bindungskapazität $c_b max$ im therapeutischen Konzentrationsbereich sättigbar ist (GLASSON et al. 1979).

Da Orosomukoid als Folge einer unspezifischen Reaktion sowohl bei Infektionen und Entzündungen als auch bei Malignomen oder Traumen im Plasma vermehrt ist, ist auch die Bindung von Propranolol und einigen anderen basischen Substanzen im Plasma bei diesen Krankheitszuständen erhöht.

PIAFSKY untersuchte die Plasmaproteinbindung von Propranolol an Patienten, die an unterschiedlichen Krankheiten litten, unter anderem an Polyarthritis, Leberzirrhose, Morbus Crohn und chronischer Niereninsuffizienz. Er stellte dabei eine enge Korrelation zwischen der Bindung von Propranolol und der Konzentration von Orosomukoid im Plasma fest (PIAFSKY et al. 1978, PIAFSKY 1980). Eine Ausnahme bildete lediglich eine Gruppe von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne entzündliche Begleiterkrankungen, bei denen die Konzentration von Orosomukoid im Plasma zwar erhöht, die Bindung von Propranolol jedoch nicht verändert war. PIAFSKY vermutete, daß die unveränderte Bindung bei chronischer Niereninsuffizienz das Ergebnis zweier gegensätzlich wirkender Mechanismen ist, nämlich des erhöhten Orosomukoidgehaltes auf der einen und der Verdrängung durch endogene Substanzen auf der anderen Seite.

Den Gehalt an Orosomukoid konnten wir nicht bestimmen, da uns kein Antiserum gegen Kaninchenorosomukoid zur Verfügung stand. Doch es ist bekannt, daß auch Kaninchen Orosomukoid besitzen, das dem menschlichen in seinem Molekulargewicht, seiner Aminosäurenzusammensetzung und dem Zuckeranteil sehr ähnlich ist (CHARLWOOD et al. 1976). Wir vermuten deshalb, daß auch Kaninchenorosomukoid Pharmaka binden kann. Unsere Bindungsergebnisse mit Propranolol an Kaninchenplasma ließen sich unter dieser Voraussetzung durch einen veränderten Gehalt an Orosomukoid erklären. Es ist wahrscheinlich, daß Orosomukoid auch beim Kaninchen sowohl bei akuter Niereninsuffizienz als auch bei Operationstraumen im Plasma vermehrt ist.

Die Bindung an Orosomukoid spielt bei den übrigen untersuchten Basen (Imipramin, Chinidin und Diazepam) wahrscheinlich eine geringere Rolle als beim Propranolol, sodaß wir bei diesen Substanzen keine erhöhte Bin-

dung fanden. Diazepam hat einen pK-Wert von 3,3 und liegt im Plasma bei pH 7,4 im Gegensatz zu den anderen Basen (vgl. 2.2.3.) praktisch nicht ionisiert vor. Außerdem ist bekannt, daß Diazepam an Bindungsstellen bindet, an die auch saure Substanzen, z.B. Salicylate und Proprionsäurederivate, gebunden werden (SJÖHOLM et al. 1979). Damit wäre erklärbar, daß die Bindung von Diazepam bei Niereninsuffizienz ebenso vermindert ist wie die Bindung der sauren Substanzen.

4.4.3. Abhängigkeit der Bindung vom Grad der Niereninsuffizienz

Wir untersuchten die Abhängigkeit der Bindung vom Grad der Niereninsuffizienz am Beispiel von Phenytoin, weil die Bindung von Phenytoin bei allen drei Methoden zur Erzeugung der Niereninsuffizienz im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant verändert war.
Sowohl Kreatinin als auch Harnstoff sind als Maß für die Einschränkung der Nierenfunktion geeignet (KUHLMANN 1980). Wir prüften deshalb zunächst am Beispiel der mit Uranylnitrat behandelten Tiere den Zusammenhang zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und der Konzentration von Kreatinin und Harnstoff. Dabei zeigte sich, daß die Korrelation zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und der Konzentration von Kreatinin ebenso gut war wie die Korrelation zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und der Konzentration von Harnstoff. Möglicherweise ist auch der freie Anteil von Phenytoin ein geeignetes Maß für die Einschränkung der Nierenfunktion.
Um diese Aussage zu bestätigen, wurde die Korrelation zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und der Konzentration von Kreatinin auch bei den Tieren untersucht, bei denen die Niereninsuffizienz durch die beiden anderen Methoden erzeugt worden war. Hierbei zeigten sich Unterschiede zwischen den drei Methoden (vgl. Tab. 4).

Die beste Korrelation fanden wir bei den mit Uranylnitrat behandelten Tieren, die schlechteste bei den nephrektomierten Tieren. Betrachtet man die errechneten Regressionsgeraden, so zeigt sich, daß der Regressionskoeffizient bei den mit Glycerin behandelten Tieren am höchsten ist, was bedeutet, daß die Behandlung mit Glycerin eine geringere Erhöhung der Kreatininkonzentration im Verhältnis zur Erhöhung des freien Anteils von Phenytoin hervorruft. Bei den nephrektomierten Tieren ist der Regressionskoeffizient am kleinsten: Der Einfluß auf die Bindung von Phenytoin war gering im Vergleich zu den Kreatininwerten. Bei keinem nephrektomierten Tier stieg der freie Anteil von Phenytoin über 15 %, obwohl bei einigen Tieren sehr hohe Kreatininwerte über 12 mg% auftraten.

Die unterschiedlichen Regressionskoeffizienten in den drei Gruppen sind möglicherweise auf eine von der Niereninsuffizienz unabhängige Ursache zurückzuführen, die uns jedoch noch nicht bekannt ist.

4.4.4. Konzentrationsabhängigkeit und Bindungskonstanten

Bei vier verschiedenen Pharmaka wurde die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Pharmakons geprüft (vgl. 3.4.4.).

Bei zwei Substanzen, nämlich beim Phenytoin und beim Diazepam ließ sich keine Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration feststellen. Daraus läßt sich folgern, daß die Bindungskapazität des Proteins für diese Pharmaka sehr hoch ist. Unter dieser Voraussetzung wäre im gemessenen Konzentrationsbereich erst ein kleiner Teil der verfügbaren Bindungsstellen besetzt (vgl. SCATCHARD 1949). Vom Phenytoin ist bekannt, daß es überwiegend an Albumin gebunden wird (MEYER a. GUTTMAN 1968). Da die basische Substanz Diazepam in unseren Versuchen ähnliche Bindungskonstanten im Blutplasma zeigt, ist zu vermuten, daß es an Bindungsstellen mit vergleichbaren Eigenschaften, möglicherweise sogar an die gleichen Bindungsstellen bindet.

Andere Bindungseigenschaften finden wir beim Propranolol und beim Chinidin, bei denen die Bindungslinien in der Darstellung nach SCATCHARD gekrümmt sind, und zwar sowohl bei den niereninsuffizienten Tieren wie bei den Kontrollen. Eine derartige Krümmung kann verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel:

1. Inhomogenität des Liganden
2. Inhomogenität des Proteins
3. kooperative Wechselwirkungen von Bindungsstellen infolge einer Konformationsänderung am Protein
4. unterschiedliche Bindungsstellen am Protein
5. Selbstaggregation des Liganden an der Grenzfläche Protein/Wasser

Die verwendeten Substanzen Propranolol und Chinidin wurden von der Herstellerfirma in großer Reinheit bezogen. Ein inhomogenes Verhalten dieser Substanzen ist nicht bekannt. Die verwendeten Substanzen lagen im Mikromolbereich. Ob diese geringen Konzentrationen Konformationsänderungen am Protein auslösen können, konnte in unseren Versuchen nicht entschieden werden. Da wir keine Proteinpräparationen, sondern unbehandeltes Blutplasma verwendeten, ist jedoch wahrscheinlich, daß die in vitro gemessenen Effekte auch im lebenden Organismus auftreten.

Die gekrümmten Bindungslinien sind am ehesten durch unterschiedliche Bindungsstellen am Protein erklärbar. Wir finden beim Propranolol zwei unterschiedliche Bindungsanteile, nämlich eine sättigbare Bindung mit hoher Affinität im niedrigen Konzentrationsbereich, deren Bindungskapazität, nicht aber deren Bindungsaffinität bei Niereninsuffizienz erhöht ist, sowie einen Bindungsanteil niedriger Affinität mit hoher Bindungskapazität, die im gemessenen Konzentrationsbereich nicht sättigbar ist. Im diesen höheren Konzentrationsbereichen traten keine Unterschiede zwischen insuffizienten Tieren und den Kontrollen auf. Die erhöhte Bindungskapazität bei gleicher Bindungsaffinität ließe sich durch eine erhöhte Konzentration von Orosomukoid erklären, wenn man voraussetzt, daß Orosomukoid beim Kaninchen ähnliche Eigenschaften besitzt wie beim Menschen (vgl. 4.4.2.).

Schwieriger sind die Ergebnisse beim Chinidin zu interpretieren, konnten wir doch im niedrigen Konzentrationsbereich keine signifikanten Unterschiede zwischen den niereninsuffizienten Tieren und den Kontrolltieren messen. Unterschiede in den Bindungskonstanten finden wir jedoch im Bereich höherer Konzentration. Die Bindung ist im Bereich zwischen c_b = 50 µmol bis 200 µmol bei den niereninsuffizienten Tieren vermindert, wobei nicht die Bindungskapazität vermindert ist (sie läßt sich

nicht beurteilen, da wir nicht mit höheren Konzentrationen messen konnten) sondern vor allem die Bindungsaffinität vermindert ist. Die verminderte Affinität ist am ehesten durch kompetitive Verdrängung aus der Proteinbindung erklärbar.Ähnlich wie bei den Patienten, die PIAFSKY (1978) untersucht hatte, ist auch hier wahrscheinlich, daß die zunächst unverändert scheinende Bindung von Chinidin das Ergebnis zweier gegensätzlich wirkender Mechanismen ist: nämlich des erhöhten Orosomukoidgehalts und der Verdrängung durch endogene Substanzen aus der Plasmaproteinbindung.

4.5. Vergleich der experimentell erzeugten Bindungsänderungen mit Ergebnissen von menschlichen Patienten

Die Tabelle 7 zeigt einen Vergleich der bei unseren Versuchen am Kaninchen erzeugten Änderungen der Bindung an Plasmaproteine mit Ergebnissen von menschlichen Patienten aus der Literatur. Die unterschiedlichen Ursachen des Nierenversagens beim Menschen konnten in dieser Zusammenstellung nicht berücksichtigt werden, da diese in der Mehrzahl der zitierten Arbeiten nicht aufgeschlüsselt sind.

Tabelle 7: Plasmaproteinbindung bei Niereninsuffizienz

A. in der vorliegenden Arbeit beschriebene Änderung bei Kaninchen

B. in der Literatur beschriebene Änderung bei menschlichen Patienten

Substanz	Kaninchen A	Mensch B	Literatur Zitat
Säuren			
Acetyl-salicylsäure	red.	red.	Andreasen 1974
Phenytoin	red.	red.	Andreasen 1974
		red.	Shoeman a. Azarnoff 1972
Warfarin	red.	red.	Belpaire et al. 1977 b
		red.	Andreasen 1974
Phenylbutazon	red.	red.	Andreasen 1974
		red.	Sjöholm et al. 1975
Thiopental	red.	red.	Andreasen 1974
Pentobarbital	red.	red.	Ehrnebo a. Odar-Cederlöf 1975
		red.	Reidenberg et al. 1976
Basen			
Diazepam	red.	red.	Sjöholm et al. 1975
Chlorpromazin	n.v.	n.v. oder erh.	Piafsky et al 1978
Propranolol	erh.*	n.v. oder erh.	Piafsky et al 1978
Chinidin	n.v.	n.v.	Reidenberg a. Affrime 1973
neutrale Pharmaka			
Digitoxin	n.v.	n.v.	Storstein 1976
		red.	Belpaire et al. 1977 b
		red.	Pérez-Mateo a. Erill 1977

red. = reduzierte Bindung

n.v. = nicht veränderte Bindung

erh. = erhöhte Bindung

* gilt nur für Behandlung mit Uranylnitrat sowie Glycerin

Die Tabelle zeigt, daß die Auswirkungen einer experimentell an Kaninchen erzeugten akuten Niereninsuffizienz auf die Bindung von Pharmaka an Plasmaproteine mit denen am Menschen im wesentlichen vergleichbar sind. Die Plasmaproteinbindung der aufgeführten sauren Substanzen ist beim Menschen ebenso wie beim Kaninchen durch Niereninsuffizienz vermindert.

Bei den basischen Substanzen hingegen waren die Ergebnisse in unseren Versuchen weniger einheitlich, doch zeigt sich auch darin eine gewisse Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei menschlichen Patienten. Die Bindung von Diazepam ist bei Niereninsuffizienz auch beim Menschen vermindert. Bei Chlorpromazin und Propranolol stellten PIAFSKY et al. (1978) zum Teil eine erhöhte, sonst aber nicht veränderte Bindung fest. In unseren Versuchen mit Kaninchen war die Bindung von Propranolol bei den Tieren, die mit Uranylnitrat oder mit Glycerin behandelt waren, im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht. Eine Ausnahme bildeten die operierten Tiere, denn wir fanden sowohl bei den nephrektomierten als auch bei den scheinoperierten Tieren eine erhöhte Bindung. Wahrscheinlich bewirkt das Operationstrauma allein eine Erhöhung der Bindung von Propranolol. Beim Chinidin schließlich ist die Bindung an Plasmaproteine auch beim Menschen nicht verändert.

Bei dem neutralen Pharmakon Digitoxin stellten einige Autoren bei Menschen eine leicht verminderte Bindung fest, STORSTEIN (1976) fand allerdings keine signifikanten Unterschiede. Bei unseren Kaninchen hatten wir auch keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Experimentell erzeugte Niereninsuffizienz beim Kaninchen ist daher ein geeignetes Modell für die Änderung der Bindung durch Niereninsuffizienz beim Menschen. Zur Erzeugung einer Niereninsuffizienz scheinen alle drei Methoden geeignet, wenn sie im Vergleich betrachtet werden. Akute und chronische Niereninsuffizienz kann

beim Menschen ebenfalls unterschiedliche Ursachen haben und zeigt unterschiedliche Begleiterscheinungen, wie wir sie beim Kaninchen im Vergleich zwischen operativen und nicht operativen Methoden fanden.
Aufgrund der guten Übereinstimmung ist zu erwarten, daß Voraussagen über die Änderung der Plasmaproteinbindung weiterer Substanzen beim Menschen aus Ergebnissen von Tierversuchen möglich sind. Darüberhinaus könnte es sich als hilfreich erweisen, Änderungen weiterer pharmakokinetischer Parameter, zum Beispiel des Verteilungsvolumens und der Halbwertszeit, am tierexperimentellen Modell zu untersuchen, sobald wir Hinweise haben, daß auch darin eine gute Übereinstimmung besteht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluß des akuten Nierenversagens auf die Bindung von Pharmaka an Plasmaproteine am tierexperimentellen Modell untersucht, wobei eine akute Niereninsuffizienz an Kaninchen durch drei verschiedene Methoden erzeugt wurde. Einer Gruppe von Tieren wurde Uranylnitrat (2 mg/kg i.v.), einer weiteren Gruppe wurde Glycerin (6,5 ml/kg s.c.) injiziert. Die jeweiligen Kontrollgruppen erhielten entsprechende Volumina isotoner Kochsalzlösung. Bei einer dritten Gruppe wurde die Niereninsuffizienz durch subtotale Nephrektomie erzeugt. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde einer Scheinoperation unterzogen.
Alle nephrektomierten sowie die mit Uranylnitrat behandelten und die Mehrzahl der mit Glycerin behandelten Tiere zeigten deutliche Zeichen einer Niereninsuffizienz.

Die Plasmaproteinbindung von Phenytoin, einer schwachen Säure, war bei allen niereninsuffizienten Kaninchen deutlich vermindert. Zwischen dem freien Anteil von Phenytoin und der Plasmakreatininkonzentration bestand eine positive Korrelation. Die Bindung von Propranolol, einer schwachen organischen Base, war hingegen bei allen niereninsuffizienten Kaninchen erhöht, allerdings auch bei der operierten Kontrollgruppe. Eine Korrelation zur Kreatininkonzentration im Plasma bestand bei den operierten Tieren nicht.
Bei einigen Gruppen von Tieren wurde die Bindung weiterer Substanzen untersucht. Bei allen untersuchten organischen Säuren war die Bindung vermindert (Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon, Warfarin, Thiopental, Pentobarbital). Bei den anderen untersuchten Basen zeigten sich dagegen keine Unterschiede (Chlorpromazin, Chinidin, Imipramin), mit Ausnahme des Diazepam, dessen Bindungsverhalten dem der Säuren ähnlich war.

Da ähnliche Änderungen der Plasmaproteinbindung auch bei menschlichen Patienten beobachtet wurden, erscheint die mit diesen Methoden erzeugte experimentelle Niereninsuffizienz beim Kaninchen ein geeignetes Modell für die Untersuchung weiterer Einflüsse der Niereninsuffizienz auf die Pharmakokinetik zu sein. Da Niereninsuffizienz beim Menschen unterschiedliche Ursachen haben kann, sollten zum Vergleich mehrere experimentelle Methoden mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus benützt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1) Andreasen, F.
The effect of dialysis on the protein binding of drugs in the plasma of patients with acute renal failure
Acta pharmacol. toxicol. 34, 284-294, 1974

2) Ayer, G., A. Grandchamps, T. Wyler, and B. Truniger
Intrarenal hemodynamics in glycerol-induced myohemoglobinuric acute renal failure
Circulat. Res. 29, 128-135, 1971

3) Belpaire, F., M. Bogaert, M. De Broe, M. Mussche
Serum binding of quinidine in experimental acute renal failure
Pharmacology 15, 311-317, 1977 a

4) Belpaire, F., M. Bogaert, M. Mussche
Influence of acute renal failure on the protein binding of drugs in animals and man
Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 27-32, 1977 b

5) Borga, O., K.M. Piafsky, O.G. Nilsen
Plasma binding of basic drugs
Clin. Pharmacol. Ther. 22, 539-544, 1977

6) Brodie, B.B., L.C. Mark, E.M. Papper, P.A. Lief, E. Bernstein, E.A. Rovenstine
The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. 98, 85-96, 1950

7) Buchborn, E.
Akutes Nierenversagen
in: Siegenthaler, W. (Hrgb.)
Klinische Pathophysiologie
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1976, S. 900-903

8) Burns, J.J., R.K. Rose, T. Chenkin, A. Goldman,
A. Schulert, B.B. Brodie
The physiological disposition of phenylbutazone in man
and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. 109, 346-357, 1953

9) Cameron, G.R., E.S. Finck
The production of acute hemolytic crisis by the sub-
cutaneous injection of glycerol
J. Path. Bact. 71, 165-171, 1956

10) Camus, J., et P. Pagniez
Hémoglobinurie d´origine musculaire
C. R. Acad. Sci. (Paris) 135, 1010-1013, 1902

11) Chakrabarti, S.K.
Cooperativity of warfarin binding with human serum al-
bumin induced by free fatty acid anion
Biochem. Pharmacol. 27, 739-743, 1977

12) Charlwood, P.A., M.W.C. Hatton, E. Regoeczi
On the physicochemical and chemical properties of
α_1-acid glycoproteins from mammalian and avian plasmas
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 453, 81-92, 1976

13) Chen, R.F.
Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment
J. biol. Chem. 242, 173-181, 1967

14) Chignell, C.F.
Physical methods for studying drug-protein binding
in: Brodie, B.B., J.R. Gillette (Hrgb.), Bd. 28,
Springer-Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 1971,
S. 187-212

15) Craig, W.A., M.A. Evenson, K.P. Saroar, J.P. Wagnild
Correction of protein binding defect in uremic sera by charcoal treatment
J. Lab. clin. Med. 87, 637-647, 1976

16) Edwards, D.J., D. Lalka, F. Cerra, R.L. Slaughter
Alpha$_1$-acid glycoprotein concentration and protein binding in trauma
Clin. Pharmacol. Ther. 31, 62-67, 1981

17) Ehrnebo, M., and I. Odar-Cederlöf
Binding of amobarbital, pentobarbital, and diphenylhydantoin to blood cells and plasma proteins in healthy volunteers and uremic patients
Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 445-453, 1975

18) Erill, S., R. Calvo, R. Carlos
Plasma protein carbamylation and decreased acidic drug binding in uremia
Clin. Pharmacol. Ther. 27, 612-618, 1980

19) Finck, E.S.
The indirect action of glycerol on the renal tubules in the rat
J. Path. Bact. 78, 197-202, 1959

20) Finck, E.S.
Glycerol induced oliguria and reduced glomerular filtration in the rat
Brit. J. exp. Path. 46, 119-124, 1965

21) Flamenbaum, W., M.L. Huddleson, J.S. Mc Meil, R.J. Hamburger
Uranyl-nitrate induced acute renal failure in the rat: Micropuncture and renal hemodynamic studies
Kidney int. 6, 408-418, 1974

22) Fremstad, D.
Influence of plasma and tissue binding on the distribution of quinidine and phenytoin in the rat.
Acta physiol. scand., suppl. 396, 24, 1973

23) Fremstad, D., K. Bergerud, J.F.W. Haffner, P.K.M. Lunde
Increased plasma binding of quinidine after surgery
Europ. J. Pharmacol. 10, 441-444, 1976

24) Giacomini, K.M., S.M. Roberts, G. Levy
Evaluation of methods for producing renal dysfunction in rats
J. pharm. Sci. 70, 117-121, 1981

25) Glasson, S., R. Zini, P. D'Athis, J.P. Tillement, J.R. Boissier
The distribution of bound propranolol between the different human serum proteins
Molec. Pharmacol. 17, 181-191, 1979

26) Goormaghtigh, N.
The renal arteriolar changes in the anuric crush syndrome
Amer. J. Path. 23, 513-524, 1947

27) Grafnetterova, J., D. Grafnetter, O. Schück, D. Tomkova, J. Blaha
The effect of endogenous compounds, isolated from sera of uremic patients, on chloramphenicol binding to proteins
Biochem. Pharmacol. 28, 2923-2928, 1979

28) Hayman, J.M., N.P. Shunway, P. Dunke, and M. Miller
Experimental hypostenuria
J. clin. Invest. 18, 195, 1939

29) Hollenberg, N.K., D.F. Adas, D.E. Oken, H.L. Abrams, J.P. Merill
Acute renal failure due to nephrotoxins: renal hemodynamic and angiographic studies
New Engl. J. Med. 282, 1329-1336, 1970

30) Kinniburgh, D.W., N.D. Boyd
Isolation of peptides from uremic plasma that inhibit phenytoin binding to normal plasma proteins
Clin. Pharmacol. Ther. 30, 276-280, 1981

31) Koslowsky, L.
Autolysekrankheiten in der Chirurgie
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1959

32) Kuhlmann, U.
Differentialdiagnostische Bedeutung biochemischer Serum- und Urinwerte
in: Siegenthaler, W. (Hrgb.)
Differentialdiagnose innerer Krankheiten
Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1980, 38.10-38.14

33) Kurz, H.
Pharmakokinetische Bedeutung der Proteinbindung
Klin. Wschr. 56, 1195-1204, 1978

34) Kurz, H., H. Trunk, B. Weitz
Evaluation of methods to determine protein binding of drugs
Arzneim.-Forsch. 27, 1373-1380, 1977

35) Lichtenwalner, D.M., B. Suh, B. Lorber, M.R. Rudnik, W.A. Craig
Partial purification and characterisation of the drug-binding-defect inducer in uremia
J. Lab. clin. Med. 97, 72-81, 1981

36) Meyer, M.C., D.E. Guttman
The binding of drugs by plasma proteins
J Pharm. Sci. 57, 895-918, 1968

37) Nilsen, O.G., D. Fremstad, S. Jacobsen
Increased binding of quinidine to serum protein and lipoproteins in anuric rats
Europ. J. Pharmacol. 33, 131-139, 1975

38) Odar-Cederlöf, J., Borga, O.
Kinetics of diphenylhydantoin in uremic patients: consequences of decreased plasma protein binding
Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 31-37, 1974

39) Odar-Cederlöf, J., Borga, O.
Plasma protein binding of phenytoin and warfarin in patients undergoing renal transplantation
Clin. Pharmacokin. 2, 147-153, 1977

40) Ormrod, D., and T. Miller
Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia
Nephron 26, 249-254, 1980

41) Pérez-Mateo, M., and S. Erill
Protein binding of salicylate and quinidine in plasma from patients with renal failure, chronic liver disease and chronic respiratory insufficiency
Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 225-231, 1977

42) Pfeffer, M.
COMPT, a time-sharing program for nonlinear regression analysis of compartment models of drug distribution
J. Pharmacokin. Biopharm. 1, 137-163, 1973

43) Piafsky, K.M.
Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs
Clin. Pharmacokin. 5, 246-262, 1980

44) Piafsky, K.M., O. Borga, J. Odar-Cederlöf, C. Johannson, F. Sjöqvist
Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of α_1-acid glycoprotein
New Engl. J. Med. 1435-1439, 1978

45) Reidenberg, M.M., and M. Affrime
Influence of disease on binding of drugs to plasma proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 226, 115-126, 1973

46) Reidenberg, M.M., J. Odar-Cederlöf, C. von Bahr, O. Borga, F. Sjöqvist
Protein binding of diphenylhydantoin and desmethylimipramine in plasma from patients with poor renal function
New Engl. J. Med. 285, 264-267, 1971

47) Rosenthal, H.E.
A graphic method for determination and presentation of binding parameters in a complex system
Analyt. Biochem. 20, 525-532, 1967

48) Rother, K.O.
Experimentelle Nierenkrankheiten
in: Eichler, O., A. Farah, H. Herken, A.D. Welch (Hrgb.)
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 16/4
Springer-Verlag, Heidelberg New York, 1965, 1-220

49) Rowland, M., Th.N. Tozer
Clinical pharmacokinetics: concepts and applications
Lea & Febiger, Philadelphia, 1980, 230-245

50) Sachs, L.
Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung
5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1978

51) Sarre, H., and K. Rother
Akutes Nierenversagen
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1962

52) Scatchard, G.
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672, 1949

53) Scholtan, W.
Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Serumproteinbindung von Arzneimitteln
Arzneim.-Forsch. 28, 1937-1047, 1978

54) Shoeman, D.W., and D.L. Azarnoff
The alteration of plasma proteins in uremia as reflected in their ability to bind digitoxin and diphenylhydantoin
Pharmacology 7, 169-177, 1972

55) Siebert, H.G.
Erkrankungen der Niere
in: Gross, R. und P. Schölmerich (Hrgb.)
Lehrbuch der innneren Medizin
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart New York, 1977, 904-908

56) Sjöholm, I., B. Ekman, A. Kober, I. Ljungstedt-Pahlman, B. Seiving and T. Sjödin
Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specifity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles
Molec. Pharmacol. 16, 767-777, 1979

57) Sjöholm, J., A. Kober, J. Odar-Cederlöf, O. Borga
Protein binding of drugs in uremic and normal serum: The role of endogeneous binding inhibitors
Biochem. Pharmacol. 25, 1205-1213, 1975

58) Stein, J.H., M.D. Lifschitz, L.D. Barnes
Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure
Amer. J. Physiol. 234, 171-181, 1978

59) Storstein, L.
Studies on digitalis. V. The influence of impaired renal function, hemodialysis, and drug interaction on serum protein binding of digitoxin and digoxin
Clin. Pharmacol. Ther. 20, 6-14, 1976

60) Taylor, J.D., R.K. Richards, J.C. Davin, J. Asher
Plasma binding of thiopental in the nephrectomized rabbit
J. Pharm. 112, 40-48, 1954

61) Thompson, F., A.M. Joekes, D.M. Foulkes
Pharmacodynamics of propranolol in renal failure
Brit. J. Med. 2, 434-436, 1972

62) Truniger, B.
Hämaturie, Pyurie, Proteinurie und Störungen der Diurese
in: Siegenthaler, W. (Hrgb.)
Differentialdiagnose innerer Krankheiten
Thieme-Verlag, Stuttgart New York, 1980, 24.18-24.19

LEBENSLAUF

1.	Name, Vornamen	Gerdsmeier, Wolfgang Karl Willi
2.	Geburtsdatum und Ort	20. August 1952 in Bückeburg (Niedersachsen)
3.	Schulbildung	6 Klassen Volksschule 9 Klassen Gymnasium
	und Reifeprüfung	8. Juni 1973 am mathematisch-naturw. Zweig des Staatl. Gym. in Kaufbeuren
4.	Dienstzeit	16 Monate Zivildienst beim Bayer. Roten Kreuz in Kaufbeuren
5.	Studium	7 Semester Biologie/Dipl. mit Schwerpunkt Botanik 10 Semester Medizin
	und Prüfungen	Vorprüfung für Biologen am 15. Okt. 1976 an der TU München Ärztliche Prüfung am 25. April 1983 in München
6.	Approbation als Arzt	29. April 1983
7.	Berufliche Tätigkeit	seit 1. Juni 1983 als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der L.M. Universität München

Vorliegende Arbeit wurde ausgeführt von April 1980 bis Oktober 1981 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Kurz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der L.M. Universität München.